

Inkorporation von ^{14}C -Cholin in die
Phospholipide von Herz, Muskel
und Lunge
und ihre Beeinflussung durch Vorbe-
handlung mit Phenobarbital und durch
Urethannarkose

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rudolf Mück
aus Leonberg

1975

Inkorporation von ^{14}C -Cholin in die
Phospholipide von Herz, Muskel
und Lunge
und ihre Beeinflussung durch Vorbe-
handlung mit Phenobarbital und durch
Urethannarkose

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Rudolf Mück
aus Leonberg

Referent: Professor Dr. H. Kewitz

Korreferent: Professor Dr. H. Coper



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25. Juni 1975

1. Einleitung	1
1.1. Einbau von Phosphorylcholin in Lecithin	
1.2. Phosphorylierung von Cholin	
1.3. Abbau von Lecithin	
1.4. Schrittweise Methylierung von Äthanolamin	
1.5. Durch Ca^{2+} - stimulierbarer Basenaustausch	
1.6. Bildung von Lecithin aus Lysolecithin	
2. Material und Methoden	6
2.1. Tiere	
2.2. Verwendete Chemikalien	
2.3. Radioaktive Substanzen	
2.4. Gewinnung und Extraktion der Organe	
2.5. Fettextraktion	
2.6. Bestimmung des Phosphatidylcholins	
2.7. Papierchromatographie	
2.8. Hydrolyse des Phosphorylcholins	
2.9. Ionenpaarextraktion	
2.10. Bestimmung der Konzentrationen	
2.11. Messung der Radioaktivität	
2.12. CDP - Cholin	
2.13. Phenobarbital - Vorbehandlung	
2.14. Urethan - Narkose	
2.15. Berechnung von Umsatzgeschwindigkeiten und Umsatzzeiten	
3. Ergebnisse	14
3.1. Konzentrationen	
3.2. Verhalten der Radioaktivität im Blut	16
3.3. Verhalten der Radioaktivität im Herzen	19
3.3.1. Kontrolltiere	
3.3.2. Vorbehandlung mit Phenobarbital	
3.3.3. Urethannarkose	
3.4. Verhalten der Aktivität im Skelettmuskel	25
3.4.1. Kontrolltiere	
3.4.2. Vorbehandlung mit Phenobarbital	
3.4.3. Urethannarkose	

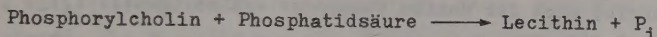
3.5. Verhalten der Aktivität in der Lunge	29
3.5.1. Kontrolltiere	
3.5.2. Vorbehandlung mit Phenobarbital	
3.5.3. Urethannarkose	
4. Diskussion	34
4.1. Unbehandelte Tiere	
4.1.1. Phosphorylierung von Cholin im Herzen und im Muskel	
4.1.2. Phosphorylierung von Cholin in der Lunge	
4.1.3. Umsatz von Phosphatidylcholin im Herzen und in der Skelettmuskulatur	
4.1.4. Umsatz von Phosphatidylcholin in der Lunge	
4.2. Phenobarbital - vorbehandelte Tiere	41
4.2.1. Gehalt an Phospholipiden	
4.2.2. Umsatz von Phosphatidylcholin	
4.3. Wirkung der Urethannarkose auf den Phospholipid- Stoffwechsel	44
5. Zusammenfassung	46
TABELLENANHANG	48
LITERATURVERZEICHNIS	52

1. Einleitung

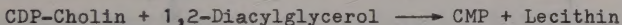
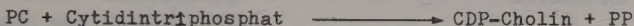
Cholin ist Bestandteil des Neurotransmitters Acetylcholin sowie der Phospholipide Lecithin, Sphingomyelin und Plasmalogen. Über den Einbau von Cholin in die Phospholipide und über deren Abbau wurden in den letzten 20 Jahren grundlegende Daten erarbeitet.

1.1. Einbau von Phosphorylcholin in Lecithin

Im Jahre 1952 berichteten KORNBERG und PRICER Jr. über die Inkorporation von Phosphorylcholin (PC), welches zugleich mit ^{32}P und ^{14}C markiert war, in die Lipide von Leberhomogenaten. Da das Verhältnis von ^{32}P zu ^{14}C in den Lipiden wenig verändert war, ist anzunehmen, daß PC als ganzes in die Phospholipide eingebaut wird. KORNBERG und PRICER Jr. postulierten folgende Reaktion:



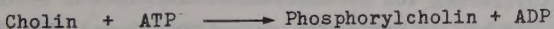
KENNEDY und WEISS (1956) gelang es jedoch in vitro zu beweisen, daß PC nicht direkt in das Lecithin eingebaut wird, sondern Cytidindiphosphatcholin (CDP-Cholin) als Zwischenprodukt entsteht:



Die Bildung des CDP-Cholins wird von dem Enzym Phosphorylcholin-Cytidyl-Transferase (EC 2.7.7.15) katalysiert. Das Enzym CDP-Cholin-1,2-Diacylglycerid-Cholinphosphotransferase (EC 2.7.8.2), das die Übertragung des Phosphorylcholinanteils des CDP-Cholins auf das Diglycerid katalysiert, ist nach Fraktionierung des Gewebes überwiegend in den Mikrosomen zu finden (WILGRAM und KENNEDY 1963; McMURRAY und DAWSON 1969). Die Übertragung des Phosphorylcholin-Anteils von CDP-Cholin auf ein Diglycerid wird in vitro durch Ca^{2+} gehemmt und verläuft in Anwesenheit eines Überschusses von CMP auch in der umgekehrten Richtung (WEISS, SMITH und KENNEDY 1958).

1.2. Phosphorylierung von Cholin

Die Phosphorylierung von Cholin und Äthanolamin wurde zum ersten Male von WITTENBERG und KORNBERG (1953) beobachtet:



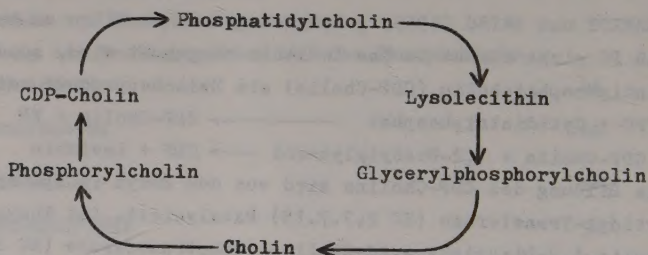
Das Enzym Phosphokinase (EC 2.7.1.32) phosphoryliert nicht nur Cholin, sondern auch eine große Anzahl von anderen Aminoalkoholen. Die Bildung von Lecithin aus Cholin über Phosphorylcholin und CDP-Cholin wird als "Kennedy-Weg" bezeichnet und konnte in den meisten Organen nachgewiesen werden.

1.3. Abbau von Lecithin

Der Abbau von Lecithin erfolgt durch Acylhydrolasen, Phospholipase A¹ und A², die die Fettsäuren von C¹ bzw. C² abspalten, zu Lysolecithin und Abspaltung der zweiten Fettsäure von Lysolecithin durch die Phospholipase B¹ bzw. B², wodurch Glycerylphosphorylcholin (GPC) entsteht (DAWSON, 1955).

GPC wird durch eine GPC-Diesterase in Cholin und Glycerophosphatidsäure gespalten. (DAWSON, 1956)

Daraus ergibt sich für Cholin folgender Zyklus (Modell 1):



Die weitere Erforschung des Cholin-Metabolismus ergab noch andere, den einfachen Zyklus nach Modell 1 komplizierende Reaktionsmöglichkeiten. Dazu gehören

1. die Bildung von Cholin durch schrittweise Methylierung von freiem Äthanolamin oder von Phosphatidyläthanolamin,
2. der durch Ca²⁺ stimulierbare Austausch der freien Basen mit den in den Phospholipiden vorhandenen,
3. die Bildung von Lecithin durch Acylierung von Lysolecithin

1.4. Schrittweise Methylierung von Äthanolamin

Zusätzlich zum sogenannten Kennedy-Weg kann Lecithin auch durch schrittweise Methylierung von Äthanolaminverbindungen gebildet werden (BREMER, FIGARD und GREENBERG, 1960; BREMER und GREENBERG,

1961). Direkter Methylgruppendonator ist S-Adenosyl-Methionin (WILSON, GIBSON und UDENFRIEND 1960). Die Methylgruppe kann aus dem Betain stammen, das durch Oxydation von Cholin entsteht und dann als Methylgruppendonator für die Bildung von Methionin dienen kann (BREMER, FIGARD und GREENBERG 1960; GROTH, BAIN und PFEIFFER 1958). Jedoch scheint dieser Weg nur in der Leber und in der Niere eine Bedeutung zu haben (SPITZER, MORRISON und NORMAN, 1968 und 1969).

Die Methylierung durch S-Adenosyl-Methionin findet hauptsächlich auf der Stufe der Phospholipide statt, wobei als Zwischenprodukte der Methylierung von Phosphatidyläthanolamin Phosphatidyl-monomethyl-äthanolamin und Phosphatidyl-dimethyl-äthanolamin (PDME) entstehen (BREMER, FIGARD und GREENBERG 1960; REHBINDER und GREENBERG 1965).

Die Methylierung von freiem Äthanolamin wurde bisher nicht nachgewiesen. Die Methylierung von Phosphoryläthanolamin findet in der Leber nicht statt (BREMER und GREENBERG 1961), im Hirn ist dagegen eine Methylierung von Phosphoryläthanolamin oder CDP-äthanolamin nicht ausgeschlossen (ANSELL und SPANNER 1971; DROSS und KEWITZ 1972).

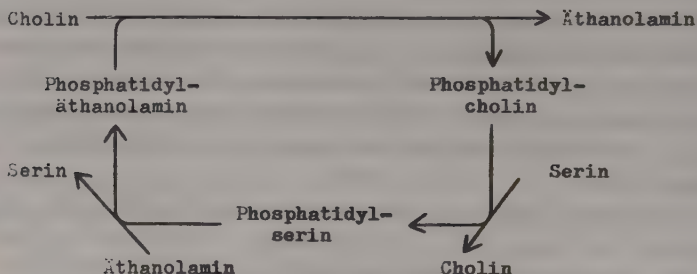
Insgesamt jedoch scheint die schrittweise Methylierung nur in der Leber einen Beitrag zur de-novo-Synthese von Lecithin zu leisten (BJØRNSTAD und BREMER 1966).

1.5. Durch Calcium stimulierbarer Basenaustausch

Freies Cholin, Äthanolamin und Serin können über einen durch Ca^{2+} stimulierbaren Austausch mit den in den Phospholipiden vorhandenen Basen in die Phospholipide in vitro eingebaut werden (DILS und HÜBSCHER 1959 und 1961). Anfängliche Hinweise, daß dieser Weg von größerer Bedeutung in der Leber sein könnte (BJERVE und BREMER 1969; TREBLE, FRUMKIN, BALINT und BEELER 1970), konnten durch neuere Arbeiten nicht bestätigt werden (BJERVE 1972, SUNDLER, ARVIDSON und ÅKESSON 1972). SALERNO und BEELER (1973) bestimmten nach intraportaler Gabe von Methyl- ^3H -Cholin die spezifische Aktivität von freiem Cholin, Phosphorylcholin, CDP-Cholin und Phosphatidylcholin bei Inkorporationszeiten von 15 Sek. bis 2 Std. und konnten zeigen, daß Cholin hauptsächlich über den

Kennedy-Weg in Lecithin eingebaut wird und der Basenaustausch zu vernachlässigen ist.

Eine größere Bedeutung scheint der Basenaustausch dagegen für den Serin-Metabolismus zu haben (BORKENHAGEN, KENNEDY und FIELDING, 1961). BJERVE (1973) schlug ein Modell vor, das Serin, Cholin und Äthanolamin transportieren kann, ohne zu einer de-novo-Synthese von Phospholipiden zu führen (Modell 2):



Bemerkenswert ist der Einfluß von Phenobarbital auf den Basenaustausch. Th. SCHWARTZKOPFF (Dissertation in Vorbereitung) stellte fest, daß nach mehrtägiger Vorbehandlung von Ratten mit Phenobarbital in der Skelettmuskulatur eine Zunahme des Austausches von freiem Cholin mit dem im Phosphatidylcholin vorhandenen eintritt.

1.6. Bildung von Lecithin aus Lysolecithin

Zwei Wege sind möglich, die zur de-novo-Synthese von Lecithin aus Lysolecithin beitragen:



Die erste Reaktion, von LANDS (1960) und LANDS und MERKL (1963) beschrieben, spielt sich hauptsächlich in den Mikrosomen ab und ist von der Anwesenheit von ATP und CoA abhängig (ERBLAND und MARINETTI, 1965b). STEIN und STEIN (1966) konnten die "Lands-Acylierung" durch die Gabe von markiertem Lysolecithin in Leber, Niere, Darm und Lunge nachweisen.

Bei der zweiten Reaktion wird eine gesättigte Fettsäure aus Position 1 eines Lysolecithin auf die Position 2 eines anderen Lysolecithin übertragen (BALINT, BEELER, TREBLE und SPITZER, 1967).

ABE, AKINO und OHNO (1972) berichteten über die ATP- und CoA-unabhängige Bildung von Lecithin aus 2 Molekülen Lysolecithin bei in-vitro-Versuchen mit Zytoplasmafraktion aus dem Lungengewebe von Ratten, zu der ^3H -Glycerol-Lysolecithin und ^{14}C -Fettsäure-Lysolecithin gegeben wurden. Dabei spielte die Bildung von Dipalmitoyl-Lecithin eine besondere Rolle.

Die Existenz anderer Reaktionswege neben dem Kennedy-Weg kompliziert die Deutung der Resultate von Untersuchungen über den Cholin-Metabolismus. Häufig lassen sich keine eindeutigen Beziehungen nach Modell 1 nachweisen. Dabei ist zu berücksichtigen, ob ^{32}P , ^3H oder ^{14}C - Markierung verwendet wird und an welchem Molekülbaustein diese Markierung sitzt.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einbau von Methyl- ^{14}C -Cholin in die Phospholipide in Herz, Muskel und Lunge der Ratte untersucht werden. Zugleich sollen die Ergebnisse unter Normalbedingungen mit denen nach mehrmaliger Vorbehandlung mit Phenobarbital verglichen werden, da bekannt ist, daß Phenobarbital einen Einfluß auf den Phospholipidmetabolismus hat (REMMER, 1959, 1963; ORRHENIUS, ERICSSON, und ERNSTER, 1965; HOLTZMAN und GILLETTE, 1966 und 1968; YOUNG, POWELL und McMILLAN, 1971). Drittens soll in denselben Organen der Cholin-Einbau in der Urethannarkose untersucht werden, einerseits um eine eventuelle Wirkung der Narkose auf den Cholin-Metabolismus festzustellen, andererseits um die Ergebnisse mit denen nach Vorbehandlung mit Phenobarbital zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley - Ratten, bezogen von der Firma Mus-Rattus, Brunnthal, Obb., im Gewicht zwischen 120 g und 180 g benutzt. Die Tiere stammten aus einer SPF - Zucht (frei von Mikroorganismen, die für Ratten pathogen sind) und wurden im Institutstierstall unter konventionellen Bedingungen gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu pelletiertem Standardfutter der Firma Altromin GmbH und Leitungswasser ad libitum.

2.2. Verwendete Chemikalien

Alle für die Versuche verwendeten Chemikalien trugen die Bezeichnung "reinst" oder "pro analysi".

2.3. Radioaktive Substanzen

Methyl - ^{14}C - markiertes Cholin mit einer spezifischen Aktivität von 60 mCi/mmol wurde vom Radiochemical Center, Amersham, England bezogen. Es wurde in physiologischer Kochsalzlösung so gelöst, daß 11,1 μCi (= 25 Mio DPM) in 0,2 ml Lösung waren.

2.4. Gewinnung und Extraktion der Organe (STONE, 1955)

Pro 100 g Körpergewicht wurden 11,1 μCi Me - ^{14}C -Cholin (= 0,2ml Lösung) in die Schwanzvene injiziert. Die Dekapitation erfolgte nach der im Ergebnisteil beschriebenen Inkorporationszeit durch einen Scherenschlag. Das Blut wurde in 20 ml eiskaltem Äthanol/Eisessig (98 %iger Äthanol und 0,2 % Eisessig) gesammelt. Die Organe Herz, Lunge und ca. 2 g , von sichtbarem Fett, Nerven und Sehnengewebe befreiter Skelettmuskel vom Oberschenkel wurden in dieser Reihenfolge möglichst rasch entnommen, gewogen und in 10 ml eiskaltem Äthanol/Eisessig mit einem Ultra-Turrax mindestens 30 Sekunden homogenisiert. Von der Dekapitation bis zur Homogenisierung des letzten Organes vergingen ungefähr 5 Minuten.

Nach Zugabe von weiteren 10 ml Äthanol/Eisessig wurden die Proben 30 Minuten geschüttelt und dann 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und bis zur Trockne eingeeengt.

2.5. Fettextraktion (DROSS und KEWITZ, 1972)

Der eingeeengte Überstand wurde mit 2 ml H_2O aufgenommen, nach Zugabe von 15 ml Heptan/Isoamylalkohol (2:1 V/V) 10 Minuten geschüttelt und zur Phasentrennung kurz zentrifugiert. Die lipophile Heptan/Isoamylalkoholphase wurde möglichst vollständig abpipettiert und die Ausschüttelung noch zweimal mit 15 ml Heptan/Amylalkohol 2:1 und danach mit 10 ml Äther wiederholt. Die klare wässrige Phase wurde wieder eingeeengt, der trockene Rückstand mit 2 ml Methanol extrahiert, um einen Teil der bei der anschließenden Papierchromatographie störenden wasserlöslichen Komponenten zu eliminieren.

2.6. Bestimmung des Phosphatidylcholins

Die gesammelten und eingetrockneten Heptan/Isoamylalkohol - und Ätherphasen wurden mit 2,5 ml Äthanol abs. aufgenommen, 1 ml zur Bestimmung der Aktivität verwendet, 0,5 ml in 4,5 ml gesättigter $Ba(OH)_2$ - Lösung 2 Stunden bei $100^{\circ}C$ im Wasserbad gekocht, was zu einer vollständigen Hydrolyse aller in den Lipoiden vorhandenen Esterbindungen führt. Ein Aliquot wurde zur Bestimmung der Cholin-Konzentration der hydrolysierten Lipide abgenommen (vgl. 2.10.).

2.7. Papierchromatographie (KEWITZ, 1959)

Papier der Firma Schleicher & Schüll Nummer 2043 b mgl X.
Absteigendes System, zwei aufeinanderfolgende Lösungsmittelgemische:

1. n-Propanol/ 0,2M Ammoniumacetat 4:1 über 20 Std.
2. n-Butanol/n-Propanol/ 98% Äthanol/ Ameisensäure/ H_2O wie 6:2:1:1:2 über 16 Std.

Um die Substanzen auf dem Chromatogramm zu lokalisieren, wurden an den Seiten eines jeden Bogens authentisches Cholinchlorid, Acetylcholinchlorid, Phosphorylcholin als Ca^{2+} -Salz und Glycerylphosphorylcholinchlorid aufgetragen. Diese Substanzen wurden nach der Chromatographie mit Dragendorff's Reagenz sichtbar gemacht (KEWITZ, 1959). Durch Betrachtung unter UV-Licht wurde die Bahn der aufgetragenen Proben verfolgt.

Cholin, das sich deutlich von den übrigen Bestandteilen trennen ließ, wurde mit Wasser 4 Std. eluiert. Phosphorylcholin und Glycerylphosphorylcholin lagen zu dicht beieinander und wurden gemeinsam mit 1 N HCl eluiert. Das Gemisch wurde 15 Min. in Wasser von 100°C inkubiert, da Glycerylphosphorylcholin in 1N HCl sehr schnell hydrolysiert wird, während Phosphorylcholin stabil bleibt (PLIMMER und BURCH, 1937; DAWSON 1955 b). Bei der anschließenden Rechromatographie wurde das aus Glycerylphosphorylcholin abgespaltene Cholin abgetrennt.

2.8. Hydrolyse des Phosphorylcholins

Phosphorylcholin kann durch Kochen in Lauge oder Säure nicht vollständig gespalten werden und wurde daher mit 2 mg/ml saurer Phosphatase (Biochemica Boehringer) in Acetat-Puffer bei pH 5,6 und 37°C 90 Minuten im Wasserbad inkubiert, wodurch eine vollständige Hydrolyse erfolgt (DROSS und KEWITZ, 1972).

2.9. Ionenpaarextraktion

Zur weiteren Reinigung diente eine Ionenpaarextraktion.

Nach der Hydrolyse wurden die getrockneten Proben mit 1 ml Dipikrylaminlösung (0,01 M Dipikrylamin in 0,1 N NaOH) aufgenommen und mit der 6 fachen Menge Dichlormethan ausgeschüttelt. Bei alkalischem pH liegt Dipikrylamin in undissoziierter Form vor und bildet mit Cholin ein Ionenpaar. Dieser Komplex ist lipophil und löst sich in Dichlormethan. Durch Filtration mit einem Phasentrennfilter konnte das Dichlormethan von der wässrigen Phase getrennt werden. Durch anschließende Ansäuerung mit 2 ml 0,05 N HCl wurde das Cholin wieder aus der Ionenpaarbindung des Dipikrylamin befreit und in die wässrige Phase übergeführt.

2. 10. Bestimmung der Konzentrationen

0,2 bis 0,4 ml der zu bestimmenden Proben wurden mit 0,1n NaOH auf 0,5 ml ergänzt und gegen 3 ml Dipikrylamin in Dichlormethan (1 mg Dipikrylamin in 100 ml Dichlormethanolösung) ausgeschüttelt. 2,5 ml der Dichlormethanphase wurden abgenommen, mit Na_2SO_4 getrocknet und die Extinktion im Zeiss Photometer bei 420 nm in Mikrorohrküvetten gegen Dichlormethan bestimmt. An Hand einer Cholin-Eichreihe wurde die Konzentration berechnet.

2. 11. Messung der Radioaktivität

0,2 bis 1 ml der Proben wurden mit 10 ml Szintillatorlösung in Dioxan aufgenommen (100 g Naphthalin, 10 g 2,5 - Diphenyloxazol (PPO), 0,25 g 2,2' - p-Phenylen-bis-(4-Methyl-5-Phenyloxazol) (Dimethyl-POPOP) pro 1 l Dioxan.

Die Impulse wurden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler Packard Tricarb Modell 3314 gemessen. Die Zählausbeute für ^{14}C betrug 70% - 80% der Zerfallsrate, die Standardstreuung höchstens 2,5%.

2.12. CDP - Cholin

Mit der beschriebenen Methode konnte CDP - Cholin nicht quantitativ extrahiert werden, sodaß auf die Bestimmung von CDP-Cholin verzichtet werden mußte.

2. 13. Phenobarbital - Vorbehandlung

80 mg Phenobarbital pro kg Körpergewicht in physiologischer Kochsalzlösung wurden am ersten Tag morgens und abends, an den folgenden zwei Tagen nur morgens i.p. injiziert. Am Morgen des vierten Tages fand der Versuch statt. Die Tiere waren zu diesem Zeitpunkt nicht narkotisiert. Während der Zeit der Vorbehandlung hatten sie freien Zugang zu Futter und Wasser. An den ersten beiden Tagen waren sie sehr schläfrig, fraßen weniger und nahmen nicht an Gewicht zu oder geringer als die Vergleichs-

tiere. Danach waren sie im allgemeinen wach, fraßen wieder normal und nahmen wie die Tiere unter Normalbedingungen um 5 bis 10 g / Tag an Gewicht zu.

2. 14. Urethan - Narkose

1,5 g Urethan pro kg Körpergewicht wurden eine halbe Stunde vor den Versuchen in wässriger Lösung i.p. injiziert. Die Tiere fielen innerhalb 10 Minuten in eine tiefe Narkose und waren auch zum Zeitpunkt der Dekapitation voll narkotisiert.

2. 15. Berechnung der Umsatzgeschwindigkeiten und Umsatzzeiten

Grundlegend für die Berechnung von Umsatzgeschwindigkeiten und Umsatzzeiten auf Grund von Tracer - Experimenten sind die Relationen der spezifischen Radioaktivitäten in den Vorstufen zu den Folgeprodukten, was erstmals von ZILVERSMIT, ENTENMAN und FISHLER (1943) dargestellt wurde. Die Autoren zeigten, daß die Kurve, in der die spezifische Aktivität des Folgeproduktes B gegen die Zeit aufgetragen ist, ihr Maximum haben muß im Schnittpunkt mit der Kurve der spezifischen Aktivität der Vorstufe A, (Abb. 1a), wenn

1. A die einzige und unmittelbare Vorstufe von B ist

($\rightarrow A \rightarrow B \rightarrow$)

2. ein steady-state herrscht ($v_{AB} = v_{BN} = v$)

$$\left[\begin{array}{l} v_{AB} = \text{Umsatzgeschwindigkeit von A nach B} \\ v_{BN} = \text{Umsatzgeschwindigkeit von B zu allen Folgeprodukten N} \end{array} \right]$$

3. die Umsatzgeschwindigkeiten über den untersuchten Zeitraum konstant sind.

Mathematisch ist diese sogenannte "precursor-product-Beziehung" gekennzeichnet durch die Gleichung

$$\frac{d \cdot SA_B}{dt} = \frac{v \cdot SA_A - v \cdot SA_B}{C_B} \quad (1)$$

Dabei bedeuten:

SA_A = spezifische Aktivität von A (in DPM/nmol)
ermittelt durch Division der Aktivität von A (in DPM/g)
durch die Konzentration von A (in nmol/g)

SA_B = spezifische Aktivität von B

C_B = Konzentration von B (in nmol/g)

v = Umsatzgeschwindigkeit = $v_{AB} = v_{BN}$ (siehe oben)

Durch Integration erhält man:

$$SA_{B_2} - SA_{B_1} = \frac{v \int_1^2 SA_A dt - v \int_1^2 SA_B dt}{C_B} \quad (2)$$

und durch Auflösen nach v :

$$v = \frac{(SA_{B_2} - SA_{B_1}) \cdot C_B}{\int_1^2 SA_A dt - \int_1^2 SA_B dt} \quad (3)$$

Spez. Aktivität

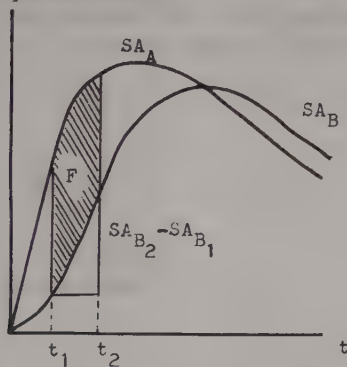


Abb. 1a: Darstellung der Beziehung der spezifischen Aktivität der Vorstufe A zum Folgeprodukt B (nach ZILVERSMIT, ENTENMAN und FISHLER, 1943)

Die Umsatzgeschwindigkeit v läßt sich aus den Verlaufskurven der spezifischen Aktivitäten von A und B errechnen, indem die Veränderung von SA_B in einem bestimmten Zeitintervall - multipliziert mit der Konzentration von B - durch die Fläche zwischen den beiden Kurven in diesem Zeitintervall dividiert wird (Formel 3). Die Fläche läßt sich durch graphische Integration mit dem Planimeter ermitteln.

Diese Berechnung wird in der Nähe des Maximums ungenau, da die Fläche zwischen den beiden Kurven gegen 0 geht und damit $v \rightarrow \infty$. Aus Umsatzgeschwindigkeit und Konzentration kann man die Umsatzzeit berechnen:

$$t_t = \frac{C_B}{v}$$

Wenn A nicht die unmittelbare Vorstufe von B ist, sondern noch ein Zwischenprodukt existiert ($\rightarrow A \rightarrow N \rightarrow B$) oder wenn A nicht die einzige markierte Vorstufe von B ist, sondern noch eine andere markierte Vorstufe von B existiert, oder wenn das System $\rightarrow A \rightarrow B \rightarrow N$ nicht im steady state ist, sondern $v_{AB} > v_{BN}$,

dann liegt das Maximum von SA_B hinter dem Schnittpunkt mit SA_A (RESCIGNO und SEGRE, S. 188 ff.) (vgl. Abb. 1b).

Spez. Aktivität

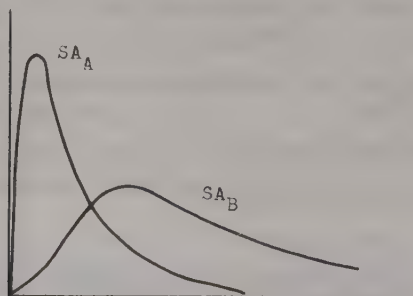


Abb. 1b
(nach RESCIGNO und SEGRE)

Wenn andererseits B mehrere Vorstufen hat, von denen nur eine, A markiert ist, oder wenn $v_{AB} < v_{BN}$, dann bleibt SA_B selbst am Maximum unter SA_A (Abb. 1c).

Spez. Aktivität

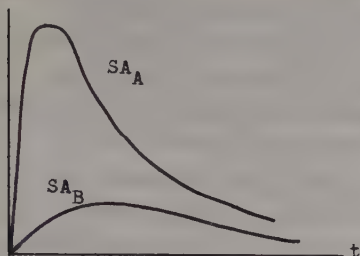


Abb. 1c

(nach RESCIGNO und SEGRE)

Aus dem Verlauf der Kurven der spezifischen Aktivitäten von A und B kann man also mit einer gewissen Einschränkung, die durch die Ungenauigkeit biologischer Systeme bedingt ist, auf die Art der "precursor-product-Beziehung" schließen (RESCIGNO und SEGRE, S. 188ff.) .

3. Ergebnisse

3.1. Konzentrationen

In allen Versuchen wurden die Konzentrationen von Cholin, Phosphorylcholin (PC), Lipidcholin und Glycerylphosphorylcholin (GPC) in den 4 untersuchten Organen Blut, Herz, Muskel und Lunge bestimmt. Tabelle I zeigt die Ergebnisse bei den unbehandelten Tieren, nach mehrtägiger Vorbehandlung mit Phenobarbital und während der Urethannarkose im Vergleich.

Alle 4 Substanzen sind im Blut in niedrigerer Konzentration vorhanden als in den übrigen drei Organen. Cholin, PC und GPC haben ungefähr dieselbe Größenordnung (5 bis 20 nmol/g), während Lipidcholin mit 2080 ± 400 nmol/g 200mal höher konzentriert ist. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gefunden.

Die Konzentration von Cholin ist im Herzmuskel und im Skelettmuskel gleich groß ($67,3 \pm 24$ nmol/g bzw. $62,2 \pm 18$ nmol/g), dagegen ist im Herzen 6-7 x mehr PC, 1,5 x mehr Lipidcholin und 4 x mehr GPC als im Skelettmuskel. Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital zeigten sich im Herzmuskel folgende signifikante Veränderungen: Die Cholin-Konzentration ist um 30% auf $47,0 \pm 15$ nmol/g ($p = 0,01$) gefallen, desgleichen die GPC-Konzentration um 29% auf 74 ± 18 nmol/g ($p = 0,001$). Dagegen blieben Lipidcholin- und PC-Konzentration unverändert.

Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich auch bei den Tieren, die mit Urethan narkotisiert waren. Auch hier läßt sich eine signifikante Abnahme der Cholin-Konzentration um 20% auf 54 ± 27 nmol/g ($p = 0,01$), der GPC-Konzentration um 33% auf 70 ± 16 nmol/g ($p = 0,001$) und der PC-Konzentration um 20% auf 159 ± 26 nmol/g ($p = 0,001$) feststellen.

Die im Skelettmuskel der Kontrolltiere gefundene Cholin-Konzentration von $62,2 \pm 18$ nmol/g stimmt mit den Werten von SCHWARTZKOPFF und von BAUMGARTEN (Inaugural-Dissertation in Vorbereitung) überein. Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital traten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede auf. Eine Abnahme des Cholin-Gehaltes, wie sie von SCHWARTZKOPFF gefunden wurde, konnte infolge der hohen Streuung von 64 ± 27 nmol/g ($\pm 42\%$)

B L U T

	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
Cholin	11,3 ± 1,9	10,4 ± 2,5	11,4 ± 4,0
PC	17,8 ± 3,4	19,9 ± 2,5	16,0 ± 3,0
Lipid	2080 ± 400	2280 ± 250	2300 ± 500
GPC	6,5 ± 3,9	4,5 ± 1,0	4,8 ± 1,0

H E R Z

	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
Cholin	67,3 ± 24	47,0 ± 15 [*]	54,0 ± 27 [*]
PC	200 ± 20	187 ± 30	159 ± 26 ^{***}
Lipid	13400 ± 2400	14500 ± 2000	15000 ± 1600
GPC	104 ± 28	74 ± 18 ^{***}	70 ± 16 ^{***}

M U S K E L

	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
Cholin	62,2 ± 18	64,0 ± 27	39,4 ± 16 ^{**}
PC	30,0 ± 12	38,6 ± 8,8	36,0 ± 8
Lipid	9400 ± 1400	8600 ± 800	9000 ± 1000
GPC	28,2 ± 5,6	25,2 ± 5,6	22,0 ± 2,7 ^{**}

L U N G E

	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
Cholin	153 ± 24	94 ± 14 ^{***}	110 ± 21 ^{***}
PC	241 ± 65	268 ± 40	219 ± 36
Lipid	15800 ± 2300	15200 ± 2400	16800 ± 1200
GPC	180 ± 23	134 ± 22 ^{***}	150 ± 27 [*]

Tab. I. Konzentration von Cholin, Phosphorylcholin (PC), Lipidcholin (Lipid) und Glycerylphosphorylcholin (GPC) in Blut, Herz, Muskel und Lunge in nmol/g bei Kontrolltieren, nach 3tägiger Vorbehandlung mit Phenobarbital und unter Urethannarkose. Mittelwert aus 13 - 15 Bestimmungen und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$). Signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren im zweiseitigen t-Test:
^{*} p = 0,01; ^{**} p = 0,005; ^{***} p = 0,001

nicht sicher nachgewiesen werden. Die Ursache der großen Streuung liegt in der Schwierigkeit der Aufarbeitung der Skelettmuskulatur, da der Gehalt an Sehngewebe die Homogenisierung sehr stört.

Die höchste Cholin-Konzentration der vier untersuchten Organe hat die Lunge mit 153 ± 24 nmol/g. Auch Phosphorylcholin (241 ± 65 nmol/g), Lipidcholin (15800 ± 2300 nmol/g) und GPC (180 ± 23 nmol/g) sind in diesem Organ am höchsten.

Wie im Herzen fand sich nach Vorbehandlung mit Phenobarbital eine Abnahme der Cholin-Konzentration um 39% auf 94 ± 14 nmol/g ($p = 0,001$) und der GPC-Konzentration um 26% auf 134 ± 22 nmol/g ($p = 0,001$) bei gleichgebliebener PC- und Lipidcholin-Konzentration. Unter Urethannarkose zeigten sich ähnliche Veränderungen, wenn auch nicht so ausgeprägt.

3.2. Verhalten der Radioaktivität im Blut

Um sich ein klares Bild über den Cholin-Metabolismus in den Organen machen zu können, ist es wichtig, das Verhalten der cholin-haltigen Substanzen im Blut zu kennen. Denn im Blut wird das Cholin transportiert, das aus dem Darm resorbiert und von den Organen abgegeben oder aufgenommen wird.

Abb. 2 und Tab. V (Anhang) zeigen das Verhalten der Radioaktivitäten und spezifischen Aktivitäten von Cholin, Phosphorylcholin, Lipidcholin und GPC im Blut. Verglichen werden Kontrolltiere mit Phenobarbital-vorbehandelten und mit Urethan-narkotisierten Tieren. Die Inkorporationszeiten liegen zwischen 1 Minute und 60 Minuten.

Die spezifische Aktivität von Cholin fällt von 8400 ± 1100 DPM/nmol nach 1 Minute ab auf 1064 ± 210 DPM/nmol nach 10 Minuten und beträgt nach 60 Minuten nur noch 145 ± 24 DPM/nmol. Der Kurvenverlauf entspricht nicht einer einfachen e-Funktion, da die Auftragung im halblogarithmischen Maßstab keine Gerade ergibt. Vielmehr handelt es sich um eine zusammengesetzte e-Funktion, wie es für das Verschwinden einer radiomarkierten Substanz in mehrere Kompartimente (Organe) charakteristisch ist.

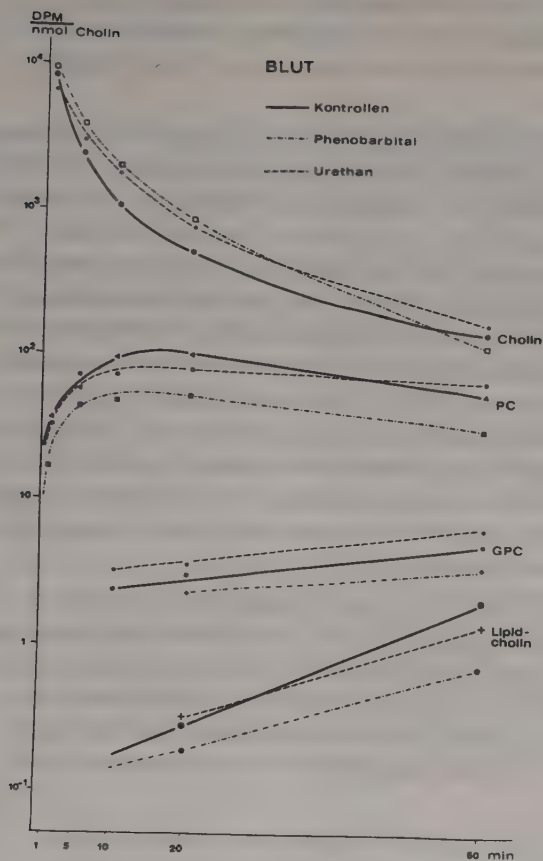


Abb. 2: Spezifische Aktivität von Cholin, Phosphorylcholin(PC), Lipidcholin und GPC im Blut von 1 Min. bis 60 Min. nach i.v.-Gabe von $11,1 \mu\text{Ci}/100 \text{ g Me-}^{14}\text{C-Cholin}$. Jeder Punkt Mittelwert aus drei Tieren. Streuung siehe Anhang Tab. V.

Auch die Kurven nach Vorbehandlung mit Phenobarbital und in der Urethannarkose zeigen einen ähnlichen Verlauf, wobei sie allerdings im Mittelteil etwas höher liegen als die Kurve der Kontrollen.

Die spezifische Aktivität des Phosphorylcholins im Blut steigt bei den Kontrolltieren in den ersten Minuten steil an, hat nach ca. 15 Minuten ein Maximum bei 100 DPM/nmol und fällt dann langsam wieder ab. Zu keiner Zeit erreicht sie die spezifische Aktivität des Cholins, sondern bleibt um mehr als 50% darunter. Dasselbe gilt auch für den Kurvenverlauf des Phosphorylcholins nach Vorbehandlung mit Phenobarbital und unter Urethannarkose. Offensichtlich entsteht das Phosphorylcholin im Blut nicht durch direkte Phosphorylierung des Blutcholins, da sonst eine "precursor-product-Beziehung" zwischen Cholin und Phosphorylcholin gemäß Abb. 1a vorliegen müßte. Das im Blut vorhandene Phosphorylcholin stammt vermutlich aus den Organen, die Cholin aus dem Blut aufnehmen und es phosphoryliert wieder abgeben.

Auch Lipidcholin und GPC im Blut stammen aus den Organen, vornehmlich aus der Leber, sodaß ihr Kurvenverlauf durch den Verlauf der spezifischen Aktivität in der Leber bestimmt wird. Lipidcholin und GPC sind noch geringer markiert als Phosphorylcholin. Erst nach 60 Minuten kann man eine deutliche Zunahme der spezifischen Aktivität des Lipidcholins feststellen.

Im GPC war in den ersten 10 Minuten keine Radioaktivität meßbar. Auch nach 10 Minuten betrug die Aktivität nur 10 DPM/g und nach 60 Minuten 30 DPM/g, was einer spezifischen Aktivität von $5 \pm 1,4$ DPM/nmol entspricht. Aussagen über signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und behandelten Tieren können jedoch wegen der Unsicherheit der Werte nicht gemacht werden.

3.3. Verhalten der Radioaktivität im Herzen

3.3.1. Kontrollen

Abb. 3 und Tab. VI (Anhang) zeigen die Radioaktivität und spezifische Aktivität von Cholin, Phosphorylcholin, Lipid-cholin und GPC im Rattenherzen bei Inkorporationszeiten zwischen 1 Min. und 60 Min.

Die spezifische Aktivität von Cholin hat nach 1 Min. ihr Maximum bereits überschritten und fällt von 3080 ± 100 DPM/nmol über 1550 ± 170 DPM/nmol nach 5 Min. auf 447 ± 103 DPM/nmol nach 10 Minuten. Sie liegt damit von Anfang an deutlich unter der spezifischen Aktivität des Cholins im Blut.

Die abfallende Cholin-Kurve schneidet das flache Maximum der Phosphorylcholin-Kurve nach ca. 10 Minuten. Der Verlauf der beiden Kurven entspricht den Bedingungen für eine "precursor-product-Beziehung", wie sie in Abschnitt 2.15. dargelegt wurden. Auf Grund der Gleichung (3) kann man die Geschwindigkeit der Phosphorylierung von Cholin für verschiedene Zeitintervalle berechnen (Tab. IIa). Es ergibt sich eine mittlere Bildungsgeschwindigkeit von Phosphorylcholin von $v = 8,0 \pm 1,8$ nmol/g/min. Bei einer Größe des Phosphorylcholin-pools von 200 nmol/g beträgt die Umsatzzeit 25 min.

Zeit- intervall /min	v /nmol/g/min		
	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
1 - 5	7,8	5,7	5,5
5 - 10	6,3	5,6	5,9
10 - 15	10,0	4,0	8,0
15 - 20	-	-	6,0
$\bar{x} \pm s$	$8,0 \pm 1,8$	$5,1 \pm 0,9$	$6,3 \pm 1,1$

Tab. IIa: Umsatzgeschwindigkeiten im Herzen, berechnet nach Gleichung (3), für die Reaktion Cholin $\rightarrow$ Phosphorylcholin, bei Kontrollen, nach Vorbehandlung mit Phenobarbital und in Urethannarkose.

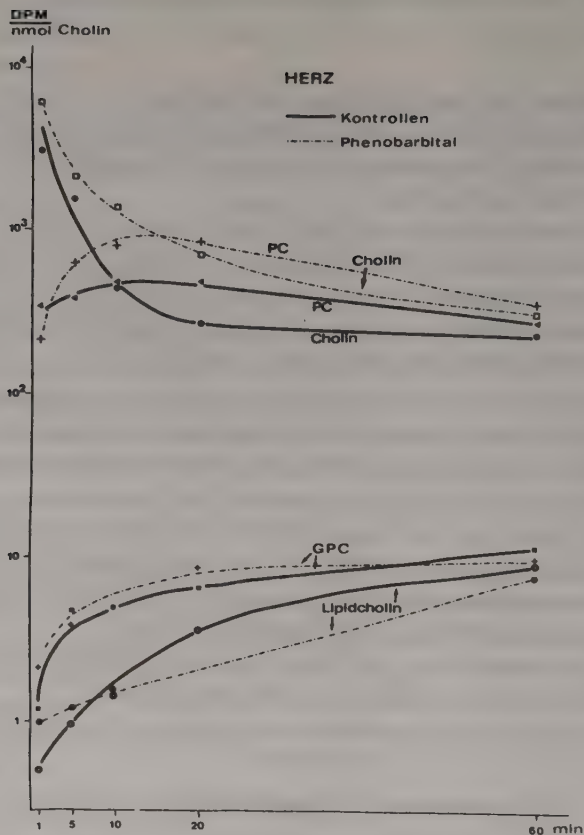


Abb. 3: Spezifische Aktivität von Cholin, Phosphorylcholin (PC), Lipidcholin und GPC im Herzen von 1 Min. bis 60 Minuten nach i.v.-Gabe von 11,1 $\mu\text{Ci}/100\text{g Me-}^{14}\text{C}$ -Cholin. Kontrolltiere und nach mehrtägiger Vorbehandlung mit Phenobarbital. Jeder Punkt Mittelwert aus drei Tieren. Streuung siehe Anhang Tab. VI.

Die spezifische Aktivität des GPC nimmt in den ersten Minuten wesentlich stärker zu als die des Lipidcholins, der Anstieg läßt dann jedoch nach, sodaß die Kurve ab 30 Minuten parallel zu der des Lipidcholins, aber um ca. 3 DPM/nmol höher verläuft. Bemerkenswert ist, daß die spezifische Aktivität beider Substanzen nach 60 Minuten ihr Maximum noch nicht erreicht hat. Zwar befindet sich nach einer Stunde der Hauptteil der im Herzen vorgefundenen Aktivität im Lipidcholin (50%), jedoch ist die spezifische Aktivität infolge des großen Lipidcholin-pools noch sehr gering und beträgt nur 1/28 der von Phosphorylcholin.

Die Transferrate von Phosphorylcholin zum Lipidcholin kann man berechnen nach der Gleichung (4) (SUNDLER, ARVIDSON und ÅKESSON, 1972) :

$$v_{PC/CDP/L} = \frac{(SA_{CDP_2} - SA_{CDP_1}) \cdot C_{CDP} + (SA_{L_2} - SA_{L_1}) \cdot C_L}{\int_1^2 SA_{PC} dt - \int_1^2 SA_L dt} \quad (4)$$

$v_{PC/CDP/L}$: Umsatzgeschwindigkeit vom Phosphorylcholin über CDP-Cholin zum Lipidcholin

$SA_{CDP_{1;2}}$: spezifische Aktivität von CDP-Cholin zum Zeitpunkt t_1 bzw. t_2

C_{CDP} : Konzentration von CDP-Cholin

$SA_{L_{1;2}}$: spezifische Aktivität von Lipidcholin zum Zeitpunkt t_1 bzw. t_2

C_L : Konzentration von Lipidcholin

SA_{PC} : spezifische Aktivität von Phosphorylcholin

Da von CDP-Cholin aus methodisches Gründen keine Werte vorliegen (vgl. 2.12.), kann die Umsatzgeschwindigkeit nur näherungsweise ermittelt werden, wenn man annimmt, daß der erste Teil der Summe im Zähler klein ist im Verhältnis zum zweiten Teil. Diese Annahme dürfte gerechtfertigt sein, da die Konzentration von CDP-Cholin gering ist im Verhältnis zur Lipidcholin-Konzentration. Daß dies so ist, kann man aus den Konzentrationen in anderen Organen schließen: So werden in der stoffwechselaktiven Leber für CDP-Cholin 50 nmol/g

(WILGRAM, HOLOWAY und KENNEDY 1960) und im Gehirn ebenfalls 50 nmol/g (ANSELL und SPANNER 1971) bei einer Lipidkonzentration von 22000 nmol/g bzw. 19000 nmol/g angegeben. Eine Frage ist es, ob die spezifische Aktivität des CDP-Cholins bzw. ihre Änderung mit der Zeit, sich sehr stark von der des Lipidcholins unterscheidet. Denn auf Grund des kleinen CDP-Cholin-pools und des sehr großen Lipidcholin-pools muß man annehmen, daß die spezifische Aktivität des CDP-Cholins eher in der Höhe des Phosphorylcholins liegt.

Drittens ist zu bemerken, daß die Berechnung für den gesamten Lipidcholin-pool gilt und unterschiedliche Umsatzzeiten einzelner Lipidfraktionen nicht berücksichtigt.

In Erwägung dieser Tatsachen wurde die Geschwindigkeit des Einbaus von Phosphorylcholin in das Lipidcholin näherungsweise berechnet nach der Gleichung (5)

$$v_{PC/L} = \frac{(SA_{L_2} - SA_{L_1}) \cdot C_L}{\int_1^2 SA_{PC} dt - \int_1^2 SA_L dt} \quad (5)$$

Zeit- intervall /min	v /nmol/g/min		
	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
1 - 5	9,0	6,9	8,5
5 - 10	5,3	3,7	4,1
10 - 15	4,4	2,6	3,0
15 - 20	4,4	2,6	3,0
20 - 40	7,7	3,7	4,9
40 - 60	12,8	6,5	8,1
$\bar{x} \pm s$	$7,3 \pm 3,3$	$4,3 \pm 1,9$	$5,3 \pm 2,4$

Tab. IIb: Umsatzgeschwindigkeiten im Herzen, berechnet nach Gleichung (5), für die Reaktion Phosphorylcholin $\rightarrow$ Lipidcholin, bei Kontrolltieren, nach Vorbehandlung mit Phenobarbital und während der Urethannarkose.

Überraschenderweise ergab sich in guter Übereinstimmung mit der Phosphorylierungsgeschwindigkeit eine mittlere Umsatzgeschwindigkeit von $7,3 \pm 3,3$ nmol/g/min (Tab. IIb). Bei einer LipidcholinKonzentration von 13400 nmol/g würde danach die Umsatzzeit des Lipidcholins ca. 36 Stunden betragen.

3.3.2. Vorbehandlung mit Phenobarbital

Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital ist die spezifische Aktivität des Cholins um 50 - 100% höher als bei den Kontrollen (Abb. 3). Dies ist sowohl durch die Abnahme der Cholin-Konzentration um 30% (Tab. I) als auch durch eine Zunahme der Aktivität um ca. 50% (Tab. VI) bedingt. Auch im Phosphorylcholin findet sich nach Vorbehandlung mit Phenobarbital mehr Aktivität, wodurch die spezifische Aktivität über der der Kontrollen liegt. Dadurch kommt es zu einem Schnittpunkt von Cholin - und Phosphorylcholin-Kurve auf einem höheren Niveau und etwas später. Die Phosphorylierungsrate ist gegenüber den Kontrollen um etwa 40% vermindert und beträgt $5,1 \pm 0,9$ nmol/g/min (Tab. IIa).

Im Lipidcholin findet man eine genauso hohe spezifische Aktivität wie bei den Kontrollen. Die Einbaurrate von Phosphorylcholin in das Lipidcholin ist ebenfalls verlangsamt und beträgt $4,3 \pm 1,9$ nmol/g/min (Tab. IIb). Die Umsatzzeit des Lipidcholins ist länger und beträgt ca. 56 Stunden. Auch der Lipidabbau ist vermindert, was sich neben der Abnahme der GPC-Konzentration auch in einer um 20 - 40% verminderten Aktivität bemerkbar macht (Tab. VI). Die spezifische Aktivität ist jedoch unverändert.

Insgesamt ist also der Lipidumsatz nach Vorbehandlung mit Phenobarbital im Herzmuskel der Ratte um ca. 40% verlangsamt.

3.3.3. Urethannarkose

Unter Urethannarkose ist die spezifische Aktivität von Cholin im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, jedoch nicht so stark wie nach Vorbehandlung mit Phenobarbital (Abb. 4 und Tab. VI).

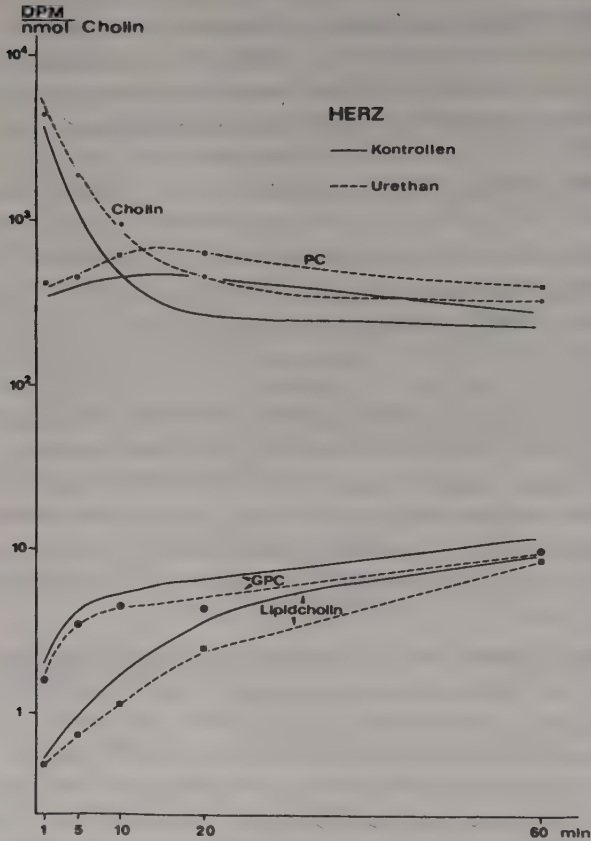


Abb. 4: Spezifische Aktivität von Cholin, Phosphorylcholin (PC), Lipidcholin und GPC im Herzen von 1 Min. bis 60 Minuten nach i.v.-Gabe von 11,1 $\mu\text{Ci}/100\text{g}$ Me-¹⁴C-Cholin. Vergleich von Kontrolltieren und Tieren in Urethannarkose. Jeder Punkt Mittelwert aus drei Tieren. Streuung siehe Anhang Tab. VI.

Auch die Kurve der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins liegt höher, während Lipidcholin und GPC einen geringeren Einbau von Aktivität zeigen (Abb. 4). Dem entspricht eine Phosphorylierungsrate von $6,3 \pm 1,1$ nmol/g/min und eine Einbaugeschwindigkeit von Phosphorylcholin ins Lipidcholin von $5,3 \pm 2,4$ nmol/g/min (Tab. IIa + b). Beide Geschwindigkeiten sind also gegenüber den Kontrollen um 15 - 25% verlangsamt. Die Umsatzzeit des Lipidcholins beträgt ca. 47 Stunden.

3.4. Verhalten der Aktivität im Skelettmuskel

3.4.1. Kontrollen

Die Skelettmuskulatur macht 45% des Körpergewichtes des Ratte aus. Nach 1 Minute findet man 54% des injizierten Cholins in der Muskulatur (J. BAUMGARTEN, Dissertation in Vorbereitung). Die spezifische Aktivität liegt jedoch ungefähr in derselben Höhe wie im Herzmuskel (Abb. 5). Sie hat nach 1 Minute ihr Maximum bereits überschritten und schneidet in ihrem abfallenden Teil die Phosphorylcholin-Kurve in deren Maximum. Dies weist auf eine "precursor-product-Beziehung" zwischen Cholin und Phosphorylcholin hin. Die Phosphorylierungsrate beträgt $3,4 \pm 1,9$ nmol/g/min (Tab. IIIa) und ist damit um mehr als die Hälfte geringer als im Herzen.

Die spezifische Aktivität des Lipidcholins steigt im Verlauf der ersten Stunde nur langsam an, ebenso die spezifische Aktivität des GPC, die wie im Herzen deutlich über der des Lipidcholins liegt. Die näherungsweise ermittelte Geschwindigkeit des Einbaus von Phosphorylcholin in das Lipidcholin beträgt $3,56 \pm 1,2$ nmol/g/min. Die Umsatzzeit des Lipids bei einer Poolgröße von 9400 nmol/g liegt danach bei ca. 44 Stunden.

3.4.2. Vorbehandlung mit Phenobarbital

Wie Abb. 5 zeigt, ist die spezifische Aktivität des Cholins nach Vorbehandlung mit Phenobarbital deutlich verringert.

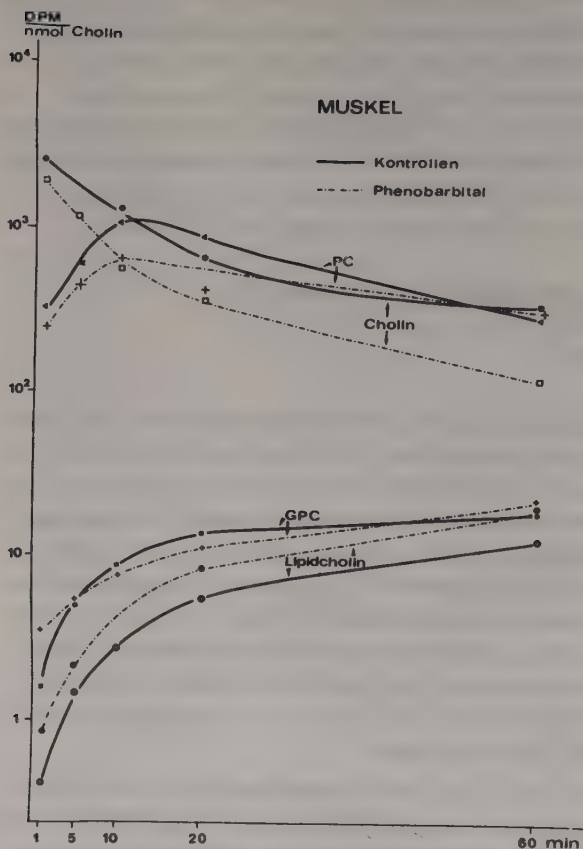


Abb. 5: Spezifische Aktivität von Cholin, Phosphorylcholin (PC), Lipidcholin und GPC im Muskel von 1 Min. bis 60 Minuten nach i.v.-Gabe von $11,1 \mu\text{Ci}/100 \text{ g Me-}^{14}\text{C}$ -Cholin. Vergleich von Kontrollen mit Vorbehandlung mit Phenobarbital. Jeder Punkt Mittelwert aus drei Tieren. Streuung siehe Anhang Tab. VII.

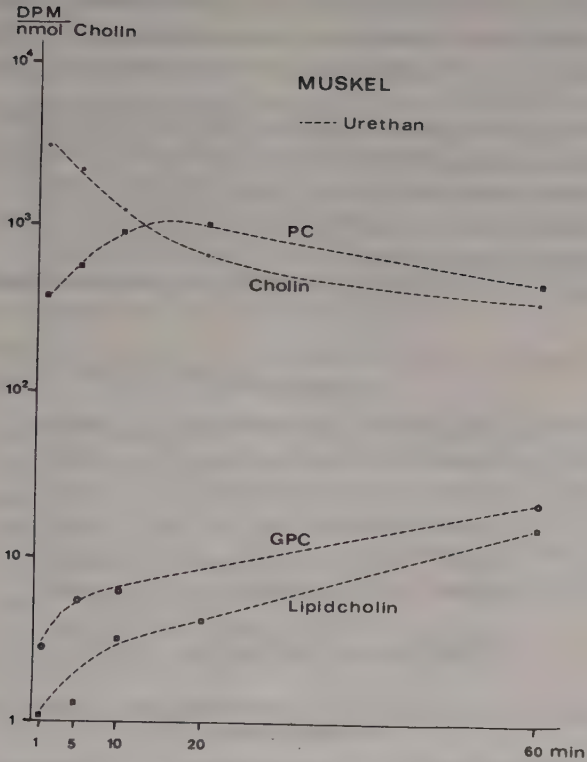


Abb. 6: Spezifische Aktivität von Cholin, Phosphorylcholin (PC), Lipidcholin und GPC im Muskel in der Urethannarkose. I.v.-Gabe von Me-¹⁴C-Cholin. Jeder Punkt Mittelwert aus drei Tieren. Streuung siehe Anhang Tab. VII.

Da jedoch auch die spezifische Aktivität im Phosphorylcholin niedriger liegt, schneiden sich Cholin - und Phosphorylcholin-Kurven zum selben Zeitpunkt wie bei den Kontrolltieren, aber auf einem niedrigeren Niveau. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit ist mit $3,1 \pm 1,5$ nmol/g/min nicht verändert (Tab. IIIa).

Im Lipidcholin findet man überraschend bei gleichgebliebener Konzentration zwischen 30% und 50% mehr Markierung inkorporiert, sodaß die spezifische Aktivität zu allen Zeitpunkten höher liegt als bei den Kontrolltieren (Abb. 5). Es scheint unmöglich, daß diese Aktivität über eine verstärkte Synthese im "Kennedy-Weg" in das Lipidcholin gelangt ist. Denn eine Zunahme

IIIa

Zeit- intervall /min	v /nmol/g/min		
	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
1 - 5	1,08	1,6	1,57
5 - 10	5,63	3,1	3,57
10 - 15	3,0	4,3	6,75
15 - 20	2,26	4,9	1,3
20 - 40	5,35	1,26	2,45
$\bar{x} \pm s$	$3,4 \pm 1,9$	$3,1 \pm 1,5$	$3,1 \pm 2,2$

IIIb

Zeit- intervall /min	v /nmol/g/min		
	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
1 - 5	5,9	9,3	7,5
5 - 10	3,1	6,4	3,1
10 - 15	2,7	6,2	2,3
15 - 20	2,8	6,2	2,2
20 - 40	2,9	8,0	3,0
40 - 60	3,9	9,9	4,6
$\bar{x} \pm s$	$3,56 \pm 1,2$	$7,6 \pm 1,6$	$3,78 \pm 2,0$

Tab. III: Umsatzgeschwindigkeiten im Muskel für die Reaktion
Cholin $\rightarrow$ Phosphorylcholin (a) und
Phosphorylcholin $\rightarrow$ Lipidcholin (b), bei Kontrollen, nach Vor-
behandlung mit Phenobarbital und in Urethannarkose.

des Einbaus von Phosphorylcholin in das Lipidcholin auf $7,6 \pm 1,6$ nmol/g/min, wie es die Berechnungen zu implizieren scheinen (Tab. IIIb), ist ohne gleichzeitige Zunahme der Phosphorylierungsrate nicht denkbar. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Aktivität über einen anderen Weg als über das Phosphorylcholin in das Lipidcholin gelangt ist. In diesem Falle würde die Kinetik des Lipidcholins der Abb. 1b folgen. Dies kann jedoch hier nicht nachgewiesen werden, da das Maximum der spezifischen Aktivität des Lipidcholins in dem untersuchten Zeitraum noch nicht erreicht wurde.

Die spezifische Aktivität des GPC unterscheidet sich nicht signifikant von der der Kontrolltiere.

3.4.3. Urethannarkose

Die Urethannarkose hat keinen Einfluß auf den Einbau von Cholin in die Phospholipide. Die spezifischen Aktivitäten sind gegenüber den Kontrolltieren nicht signifikant verändert (vgl. Abb. 6 und Tab. VII, Anhang). Auch die Umsatzgeschwindigkeiten sind mit $v_{Ch/PC} = 3,1 \pm 2,2$ nmol/g/min (Tab. IIIa) und $v_{PC/L} = 3,78 \pm 2,0$ nmol/g/min (Tab. IIIb) unverändert.

3.5. Verhalten der Aktivität in der Lunge

3.5.1. Kontrollen

Abb. 7 und Tab. VIII (Anhang) zeigen die Aktivitäten und spezifischen Aktivitäten von Cholin, Phosphorylcholin, Lipidcholin und GPC in der Lunge. Die spezifische Aktivität des Cholins, die niedriger ist als im Herzen und im Muskel, fällt bereits in den ersten 10 Minuten von 1436 ± 180 DPM/nmol auf 140 ± 44 DPM/nmol ab. Dagegen befindet sich im Phosphorylcholin schon nach 1 Minute mehr Aktivität als im Cholin (Tab. VIII Anhang), die Phosphorylierungsrate muß also sehr hoch sein. Dementsprechend liegt das Maximum der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins wesentlich früher als im Herzen und im Muskel, nämlich schon bei 3 Minuten im Ver-

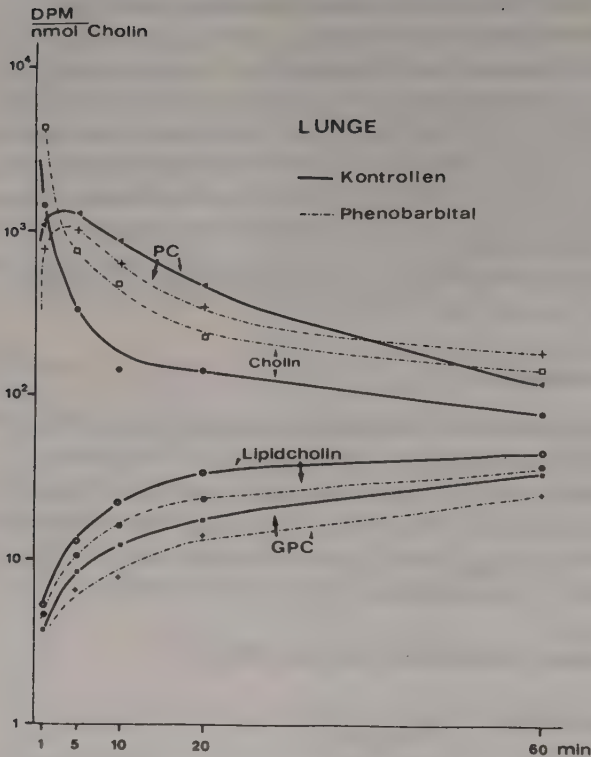


Abb. 7: Spezifische Aktivität von Cholin, Phosphorylcholin (PC), Lipidcholin und GPC in der Lunge von 1 Min. bis 60 Minuten nach i.v.-Gabe von 11,1 $\mu\text{Ci}/100\text{g Me-}^{14}\text{C}$ -Cholin. Kontrolltiere und nach Vorbehandlung mit Phenobarbital. Jeder Punkt Mittelwert aus drei Tieren. Streuung siehe Anhang Tab. VIII.

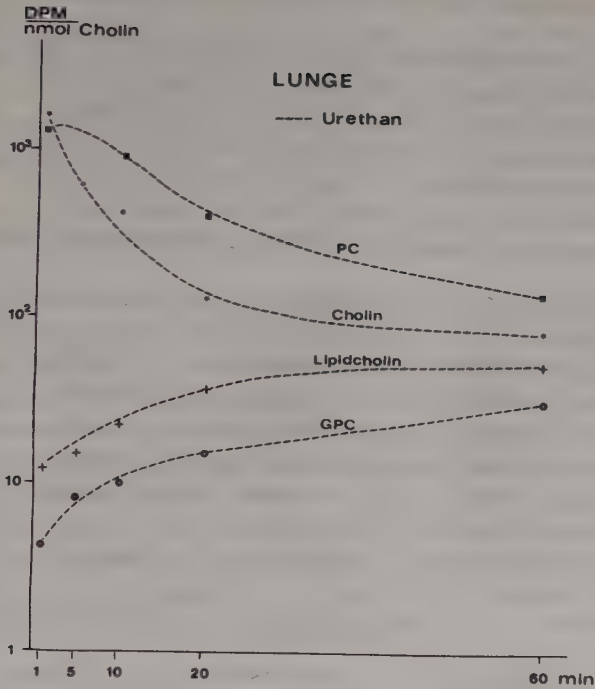


Abb. 8: Spezifische Aktivität von Cholin, Phosphorylcholin (PC), Lipidcholin und GPC in der Lunge in Urethannarkose. I.v.-Gabe von Me-¹⁴C-Cholin. Jeder Punkt Mittelwert aus drei Tieren. Streuung siehe Anhang Tab. VIII.

gleich zu 10 - 20 Minuten in den beiden anderen Organen. Es ist jedoch bemerkenswert, daß die Phosphorylcholin-Kurve ihr Maximum erst nach dem Schnittpunkt mit der abfallenden Cholin-Kurve hat. Dieser Befund wird in Abschnitt 4.1.2. diskutiert.

Bei einer Einbaugeschwindigkeit von Phosphorylcholin in das Lipidcholin von $28,3 \pm 8,0$ nmol/g/min findet man schon nach 5 Minuten im Lipidcholin mehr Aktivität als im Phosphorylcholin (Tab. VIII), und nach 60 Minuten sind 70% der in der Lunge vorhandenen Aktivität im Lipid inkorporiert; aber auf Grund des großen Lipidcholin-pools liegt die spezifische Aktivität immer noch unter der des Cholins und Phosphorylcholins.

IVa

Zeit- Intervall /min	v /nmol/g/min		
	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
1 - 5	(- 78)	26,3	(-6,7)
5 - 10	30,2	(97,4)	26,3
10 - 15	29,3	42,7	29,0
15 - 20	22,9	44,0	23,5
20 - 40	16,4	28,1	-
$\bar{x} \pm s$	$24,7 \pm 6,4$	$35,2 \pm 9,3$	$26,3 \pm 3,0$

IVb

Zeit- intervall /min	v /nmol/g/min		
	Kontrollen	Phenobarbital	Urethan
1 - 5	27,9	25,3	24,3
5 - 10	26,4	21,6	25,0
10 - 15	26,0	25,3	23,7
15 - 20	28,2	31,7	33,4
20 - 40	18,7	23,8	31,3
40 - 60	42,9	38,2	49,6
$\bar{x} \pm s$	$28,3 \pm 8,0$	$27,6 \pm 6,1$	$31,2 \pm 9,8$

Tab. IV: Umsatzgeschwindigkeiten in der Lunge für die Reaktion
Cholin $\rightarrow$ Phosphorylcholin (a) und
Phosphorylcholin $\rightarrow$ Lipidcholin (b), bei Kontrolltieren, nach
Vorbehandlung mit Phenobarbital und in Urethannarkose.

Die Umsatzzeit des Lipids beträgt bei einer Konzentration von 15800 nmol/g ungefähr 9 - 10 Stunden, ist also wesentlich geringer als im Herzen und im Muskel.

Ebenfalls im Unterschied zum Herzen und zum Muskel liegt die spezifische Aktivität des GPC in der Lunge nicht über, sondern unter der des Lipidcholins (Abb. 7). Sie erreicht jedoch trotzdem um 50 - 100% höhere Werte (Tab. VIII, Anhang) als in den beiden anderen Organen; dies kann auf die deutlich höhere spezifische Aktivität im Lipidcholin zurückgeführt werden.

3.5.2. Vorbehandlung mit Phenobarbital

Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital ist die spezifische Aktivität des Cholins um ca. 30% gegenüber den Kontrolltieren erhöht (Abb. 7). Die Kurve schneidet das Maximum der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins bei ca. 4 Minuten. Die spezifische Aktivität des Phosphorylcholins liegt gering unter der der Kontrollen. Die Phosphorylierungsrate berechnete sich auf $35,2 \pm 9,3$ nmol/g/min (Tab. IVa) und ist damit ebenso groß wie der Einbau von Phosphorylcholin in das Lipidcholin ($27,6 \pm 6,1$ nmol/g/min) (Tab. IVb). Die spezifische Aktivität des Lipidcholins liegt um etwa 20 - 30% unter der der Kontrolltiere, ebenso die spezifische Aktivität des GPC.

3.5.3. Urethannarkose

Die Urethannarkose hat keinen Einfluß auf den Einbau von Cholin in das Phosphatidylcholin in der Lunge: Die spezifischen Aktivitäten von Cholin, Phosphorylcholin, Lipidcholin und GPC sind gegenüber den Kontrolltieren nicht verändert (Abb. 8 und Tab. VIII Anhang), ebenso wenig wie die Umsatzgeschwindigkeiten (Tab. IV).

4. Diskussion

4.1. Unbehandelte Tiere

Die Verteilung von intravenös appliziertem Cholin im Blut und in den Organen der Ratte wurde von BAUMGARTEN (Inaugural-Dissertation in Vorbereitung) untersucht. Es stellte sich heraus, daß das injizierte radiomarkierte Cholin innerhalb einer Minute zu 96% die Blutbahn verläßt. 54% der applizierten Dosis werden nach 1 Minute in der Skelettmuskulatur gefunden, jedoch macht die Skelettmuskulatur auch 45% des Gewichtes der Ratte aus. Daneben zeigen Lunge, Herz und Niere eine besondere Affinität zu Cholin, denn sie nehmen im Verhältnis zu ihrem Anteil am Körpergewicht überproportional viel Cholin auf. Es sollte darum in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie schnell die Skelettmuskulatur, die Lunge und das Herz das mit dem Blut zugeführte Cholin in die Phospholipide einbauen.

4.1.1. Phosphorylierung von Cholin im Herzen und Muskel

Die Biosynthese von Lecithin im Skelettmuskel wurde von PENNINGTON und WORSFOLD (1969) untersucht. Sie zeigten, daß Muskelgewebe in vitro Phosphorylcholin und CDP-Cholin in Lecithin einbaut. Damit war nachgewiesen daß der "Kennedy-Weg" (KENNEDY und WEISS 1956) auch im Skelettmuskel funktioniert. In der vorliegenden Arbeit wurde auch der erste Schritt des Cholineinbaus, die Phosphorylierung von Cholin zu Phosphorylcholin im Herzen und Muskel der Ratte in vivo untersucht.

Beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Cholin im Herzen und Muskel einerseits und im Blut andererseits (Anhang Tab. V - VII) fällt auf, daß die spezifische Aktivität im Blut in den ersten 20 Minuten nach i.v.-Gabe des radiomarkierten Cholins deutlich höher ist als in den Organen. Es ist selbstverständlich, daß sich direkt nach Injektion des Cholins die gesamte Radioaktivität im Blut befindet und somit hier eine außerordentlich hohe spezifische Aktivität vorhanden ist. Aber auch im Herzen und

im Muskel ist das Maximum der spezifischen Aktivität des Cholins nach 1 Minute bereits überschritten, was bedeutet, daß die Hauptmenge an markiertem Cholin schon in die Organe übergetreten ist. Dies entspricht auch den Befunden von J. BAUMGARTEN. Daß trotz dieses schnellen Übertrittes von Cholin die spezifische Aktivität in den Organen niedriger bleibt als im Blut, - also eine Beziehung zwischen der spezifischen Aktivität von Blutcholin und Organ-Cholin wie in Abb. 1c (2. 15.) vorliegt - kann nur dadurch erklärt werden, daß in den Organen bereits vorhandenes und fortwährend neu gebildetes Cholin sich mit dem radiomarkierten übergetretenen Cholin mischt und damit die spezifische Aktivität erniedrigt. Herzgewebe und Muskelgewebe können demnach Cholin bilden oder freisetzen, das nicht oder erheblich weniger radiomarkiert ist.

Nicht nur im Blut, sondern auch in den Organ-Kompartimenten fällt die spezifische Aktivität von Cholin in dem untersuchten Zeitraum laufend ab. Der Ausstrom von markiertem Cholin aus dem Cholin-pool des Organes ist also größer als der Einstrom, der dem Netto-Übertritt von Cholin aus dem Blut entspricht. Ausstrom von radiomarkiertem Cholin kann nur bedeuten, daß Cholin in andere Verbindungen eingebaut wird. Eine dieser Verbindungen ist das Phosphorylcholin.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Kurve der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins im Maximum von der Kurve der spezifischen Aktivität des Cholins geschnitten wird (Abb. 3 und 5). Dies bedeutet, daß die Kinetik die Bedingungen für eine "precursor-product-Beziehung" erfüllt (ZILVERSMIT, ENTENMAN und FISHLER 1943), d.h. Cholin die einzige und unmittelbare Vorstufe von Phosphorylcholin ist. Dies schließt aus, daß

1. Phosphorylcholin durch schrittweise Transmethylierung aus Phosphorylathanolamin entsteht,
2. Phosphorylcholin in größerer Menge aus dem Blut aufgenommen wird.

Die 2. Möglichkeit wird auch noch dadurch widerlegt, daß die spezifische Aktivität von Phosphorylcholin im Blut nur 1/10

der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins im Herzen bzw. Muskel beträgt.

Mit Hilfe der Gleichung (3) konnte die Geschwindigkeit der Phosphorylierung ermittelt werden. Sie beträgt im Herzen $8,0 \pm 1,8$ nmol/g/min und im Skelettmuskel $3,4 \pm 1,9$ nmol/g/min. Dies ist niedriger als die bisher für andere Organe bekannten Werte: DROSS und KEWITZ (1972) schätzten für das Gehirn eine Phosphorylierungsrate von 20 nmol/g/min. SUNDLER, ARVIDSON und AKESSON (1972) geben für die Phosphorylierung in der Leber $1,6 \mu\text{mol/min/Leber an}$, das entspricht ungefähr 200 nmol/g/min.

4.1.2. Phosphorylierung von Cholin in der Lunge

In der Lunge fiel auf, daß die Kurve der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins ihr Maximum nach dem Schnittpunkt mit der abfallenden Kurve der spezifischen Aktivität des Cholins hat. (Abb. 7) Dies bedeutet einen Kurvenverlauf nach Abb. 1b (vgl. 2.15.). Wie in Abschnitt 2.15. erläutert ist, ergibt sich eine solche Beziehung, wenn Cholin nicht die unmittelbare Vorstufe von Phosphorylcholin ist. Dies erscheint jedoch bei Kenntnis der chemischen Zusammenhänge unwahrscheinlich.

Zweitens könnte es sein, daß die Phosphorylierungsrate höher ist als das Verschwinden von Phosphorylcholin. Auch diese Annahme ist jedoch unmöglich, da dann die Phosphorylcholin-konzentration ständig zunehmen müßte.

Drittens wäre es möglich, daß noch eine andere markierte Vorstufe von Phosphorylcholin existiert. SUNDLER, ARVIDSON und AKESSON (1972) beobachteten, daß auch in der Leber die Kurve des Phosphorylcholins von der Cholin-Kurve geschnitten wird, bevor jene ihr Maximum erreicht hat. Sie erklärten dies so, daß die eigentliche Vorstufe von Phosphorylcholin in ihrem Experiment nicht der gesamte Pool von freiem Cholin sei, sondern nur ein Teil davon mit einer höheren spezifischen Aktivität, daß sich also das injizierte Cholin nicht völlig mit dem endo-

genen Cholin vermischte. Hinweise darauf, daß exogenes Cholin anders metabolisiert werden könnte als endogen synthetisiertes, gaben auch andere Experimentatoren an (SPITZER, NORMAN und MORRISON 1969; STEIN und STEIN 1969). Speziell SPITZER et al. wiesen darauf hin, daß endogen synthetisiertes Cholin in der Lunge selektiv in Sphingomyelin eingebaut wird. Es muß aber trotz dieser Überlegungen darauf hingewiesen werden, daß die Annahme mehrerer Cholin-pools rein spekulativ ist.

Es könnte viertens auch sein, daß der Befund auf einer Ungenauigkeit der Meßergebnisse beruht. Dagegen spricht jedoch der gesamte Kurvenverlauf der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins, der weit über der Cholinkurve liegt. Selbst wenn das Maximum früher läge, könnte man diese Erscheinung nicht erklären.

Fünftens ist durch die Untersuchungen von DROSS und KEWITZ (1972) bekannt, daß im Gehirn die Cholin-Konzentration unmittelbar nach der Dekapitation mit einer Geschwindigkeit von 20 nmol/g/min zunimmt. Diese Zunahme ist eine Folge des Persistierens biochemischer Prozesse - Freisetzung von Cholin aus GPC und Lecithin - bei gleichzeitigem Stop der Durchblutung. Es ist wahrscheinlich, daß auch in der Lunge nach der Dekapitation Cholin frei wird und so eine höhere Konzentration bestimmt wurde als in vivo tatsächlich vorhanden ist. Dies würde bedeuten, daß die spezifische Aktivität des Cholins tatsächlich höher ist als berechnet, sodaß die wirkliche Cholin-Kurve über der berechneten Kurve liegt. Dann könnte sich aber auch ein Schnittpunkt im Maximum der Kurve der spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins ergeben.

Da die Beziehung der spezifischen Aktivitäten von Cholin und Phosphorylcholin nicht einer "precursor-product-Beziehung" folgt, kann die Phosphorylierungsgeschwindigkeit auch nicht korrekt berechnet werden. Der in Tab. IVa angegebene Wert von $24,7 \pm 6,4$ nmol/g/min ist ungenau, der richtige Wert dürfte jedoch innerhalb der Grenzen von 10 - 40 nmol/g/min liegen.

4.1.3. Umsatz von Phosphatidylcholin im Herzen und im Muskel

DAWSON konnte 1955 zeigen, daß in der Leber ^{32}P -markiertes Phosphatidylcholin die einzige Vorstufe von GPC ist und zwischen Phosphatidylcholin und GPC eine "precursor-product-Beziehung" besteht (DAWSON 1955a). Beim Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Lecithin und GPC im Herzen und im Muskel fällt in den vorliegenden Experimenten überraschend auf, daß die spezifische Aktivität im GPC von Anfang an höher ist als im Lecithin. Dies widerspricht aber der Tatsache, daß GPC Folge- und Abbauprodukt des Lecithins ist. Eine Inkorporation von markiertem Cholin in GPC anders als über Lecithin kann als unwahrscheinlich verworfen werden. Es ist jedoch möglich, daß der Lipidpool heterogen ist und aus verschiedenen Fraktionen mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten und Umsatzzeiten besteht. Diese Heterogenität wirkt sich bei Gabe von ^{32}P kaum aus, da nur geringe Unterschiede in der Inkorporation von ^{32}P in die Phosphatide der Rattenleber bestehen (DAWSON 1955b; BALINT, BEELE, TREBLE und SPITZER 1967). Es ist aber bekannt, daß die Phospholipide nicht nur hinsichtlich ihrer Fettsäuren-Zusammensetzung heterogen sind (BALINT et al.; ARVIDSON 1968; SPITZER, NORMAN und MORRISON 1969; VAN GOLDE, SCHERPHOF und VAN DEENEN 1969), sondern auch hinsichtlich der Umsatzgeschwindigkeit des Cholinanteils. So wurden in der Leber eine schnellere Phospholipid-Komponente mit einer Halbwertszeit von 13 Stunden (TREBLE, FRUMKIN, BALINT und BEELE 1970; COLLINS 1963; GURR, PROTTEY und HAWTHORNE 1965) und eine langsamere Komponente mit einer Halbwertszeit von 48 - 96 Stunden gefunden (BAILEY, TAYLOR und BARTLEY 1967; GROSS, GETZ und RABINOWITZ 1969).

Man könnte vermuten, daß die Heterogenität des Phosphatidylcholins verursacht ist durch eine Fraktion, die auf anderem Wege Cholin einbaut als über CDP-Cholin, z.B. über eine schrittweise Methylierung von Phosphatidyläthanolamin durch Methionin, wie es in der Leber nachgewiesen wurde (ARVIDSON 1968; KANOH 1969; AKINO, ABE und ARAI 1971). BJØRNSTAD und

BREMER (1966) konnten jedoch weder im Herzen noch in Niere, Dünndarm oder Lunge eine der Leber vergleichbar hohe Transmethylierung nachweisen, ebensowenig SCHWARTZKOPFF im Muskel (Inaugural-Dissertation in Vorbereitung).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch näherungsweise die Geschwindigkeit des Einbaus von Phosphorylcholin in das Phosphatidylcholin und damit die Umsatzzeit des Phosphatidylcholins berechnet. Die Umsatzzeit des Phosphatidylcholins beträgt im Herzen 36 Stunden und im Skelettmuskel 44 Stunden. Falls der Lipidpool keinen einheitlichen Stoffwechsel aufweist, gelten die berechneten Umsatzzeiten jedoch nicht für jede der verschiedenen Fraktionen, sondern stellen einen Durchschnittswert dar.

4.1.4. Umsatz von Phosphatidylcholin in der Lunge

Im Gegensatz zum Herzen und zum Skelettmuskel wurde in der Lunge im Lipidcholin eine höhere spezifische Aktivität gefunden als im GPC. Man kann vermuten, daß dies die Folge einer größeren Homogenität der Phospholipide in der Lunge ist. Das Gesamt-Lipidcholin, dessen ermittelte Konzentration von $15,8 \pm 2,3 \mu\text{mol/g}$ mit den Literaturangaben übereinstimmt (WEINHOLD und VILLEE 1965; TIERNEY, CLEMENTS und TRAHAN 1967), besteht zu 48% aus Lecithin, 21% Sphingomyelin und 31% Kephalin (SALISBURY-MURPHY, RUBINSTEIN und BECK 1966). Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß Dipalmitoyllecithin ein Hauptbestandteil des Lungenlecithins (MORGAN, FINLEY und FIALKOW 1965; SPITZER, MORRISON und NORMAN 1968; WOLFE, ANHALT, BECK und RUBINSTEIN 1970) und der Surfactants ist (TATTIE, BENNETT und CYR 1968) im Gegensatz zu den gewöhnlich unsymmetrischen Phospholipiden mit einer gesättigten und einer ungesättigten Fettsäure in anderen Organen (TIERNEY et al. 1967; AKINO, ABE und ARAI 1971; MONTFORT, VAN GOLDE und VAN DEENEN 1971). Die Entstehung des hohen Anteils an Dipalmitoyllecithin ist noch nicht ganz geklärt. Es scheint, daß die initiale Phosphatidsynthese eine zufällige Fettsäuren-Verteilung hat (FROSOLONO, SLIVKA und CHARMS 1971; VEREYKEN, MONTFORT und VAN GOLDE 1972). Durch Transacylierung gemäß

ERBLAND und MARINETTI (1965 a, b), bei der eine Fettsäure von einem Lysolecithin auf ein anderes Lysolecithin übertragen wird, entstehen nicht-zufällige Lecithine mit zwei gesättigten Fettsäuren (FROSOLONO et al. 1971; AKINO et al. 1971; ABE, AKINO und OHNO 1972).

In der Lunge wurde mit $28,3 \pm 8,0$ nmol/g/min eine wesentlich höhere Phosphatidylcholin-Syntheserate ermittelt als im Herzen und im Skelettmuskel. Die hohe Syntheserate könnte mit der Notwendigkeit erklärt werden, den ständigen Verlust von Phospholipiden als Surfactants zu ersetzen (TIERNEY, CLEMENTS und TRAHAN 1967; ABRAMS und WIGGLESWORTH 1968). THOMAS und RHOADES (1970) konnten zeigen, daß zwischen Lungenlecithin und Alveolarlecithin eine "precursor-product-Beziehung" besteht. TIERNEY et al. schätzen den physiologischen Verlust von Dipalmitoyllecithin, welches ca. 30% der Surfactants ausmacht, auf 230 nmol/g/Std. , entsprechend 4 nmol/g/min. Es müssen also auch mindestens 4 nmol/g/min neu synthetisiert werden.

Auf Grund der Syntheserate wurde in der vorliegenden Arbeit die Umsatzzeit des Gesamt-Lungenlecithins mit 9 - 10 Stunden berechnet. Dieser Wert liegt unter den bisher von anderen Autoren geschätzten Umsatzzeiten. ABRAMS und WIGGLESWORTH (1968) ermittelten für das Gesamtlipid eine Halbwertszeit von 35 Stunden, TIERNEY et al. (1967) für Dipalmitoyllecithin 14 Stunden, THOMAS und RHOADES (1970) für das Gesamtlipid 12 Stunden (Umsatzzeit = $1,44 \times$ Halbwertszeit). Daß in der vorliegenden Arbeit niedrigere Werte ermittelt wurden, hat zwei Gründe:

1. Die früheren Ergebnisse beruhten hauptsächlich auf Versuchen mit ^{14}C -Palmitat. Da Palmitat aber durch Transacylierung innerhalb der Phospholipide eingebaut wird, hat es eine längere Umsatzzeit als der Cholinanteil der Phospholipide (VEREYKEN, MONTFORT und VAN GOLDE 1972).

2. Die früheren Berechnungen der Umsatzzeit basieren alle auf der Halbwertszeit, die in Langzeitversuchen aus der Abnahme der Aktivität ermittelt wurde. Da aber die Bestandteile des Lecithins nach dem Abbau wieder zur Synthese verwendet werden können, ergibt sich ein langsamerer Abfall der Aktivität und damit eine längere Halbwertszeit. Diese Beobachtung machten auch HOLTZMAN und GILLETTE (1968), die bei Phenobarbital-behandelten Tieren nach der Aktivitätsabnahme eine Halbwertszeit von 28 Stunden für Phospholipid-Phosphor in der Leber berechneten, aber nach der Geschwindigkeit der ^{32}P -Inkorporation nur 14 - 18 Stunden.

4.2. Phenobarbital - vorbehandelte Tiere

4.2.1. Gehalt an Phospholipiden

Verabreichung von Phenobarbital in Dosen von 70 - 100 mg/kg Körpergewicht über mehrere Tage induziert bei Ratten die Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums in den Leberparenchymzellen (REMMER und MERKER 1963). Der oxydative Abbau einiger Barbiturate und anderer Pharmaka ist beschleunigt (REMMER 1959 und 1963), die Aktivität verschiedener Enzyme ist vermehrt (ARIAS, GARTNER, FURMAN und WOLFSON 1963; ORRHENIUS, ERICSSON und ERNSTER 1965; ZEIDENBERG, ORRHENIUS und ERNSTER 1967). Die Proliferation des endoplasmatischen Retikulums drückt sich in einer Zunahme des Protein- und Phospholipidgehaltes der Mikrosomenfraktion um 30 - 80% aus (WIRTZ und ZILVERSMIT 1969; YOUNG, POWELL und MCMILLAN 1971). Auf welche Weise die Phospholipide zunehmen, ist unklar, doch kommt entweder eine gesteigerte Synthese oder ein verminderter Abbau in Frage. Studien der Inkorporation von ^{32}P in die Phospholipide nach ein- und mehrmaliger Applikation von Phenobarbital weisen auf einen verminderten Einbau hin (HOLTZMAN und GILLETTE 1966 und 1968; INFANTE, PETIT, POLONOVSKI und CAROLI 1971), während ORRHENIUS, ERICSSON und ERNSTER (1965) mit derselben Methode eine vermehrte Synthese feststellten.

YOUNG, POWELL und McMILLAN (1971), die markiertes Cholin und in den Methylgruppen markiertes Methionin gaben, berichteten über eine Stimulation der schrittweisen Methylierung von Phosphatidyl-äthanolamin, aus der die Zunahme der Phospholipide resultieren soll. DAVISON und WILLS (1973) konnten jedoch keine Veränderung in den Proportionen der Phospholipidgruppen, wie es zu erwarten gewesen wäre, nachweisen und stellten daher YOUNGs Annahme in Frage.

Die Stoffwechselveränderungen in der Leber nach Vorbehandlung mit Phenobarbital wirken sich auch auf den Phospholipidmetabolismus im Blut aus. In Übereinstimmung mit INFANTE, PETIT, POLONOVSKI und CAROLI (1971) fand sich in den eigenen Untersuchungen nur eine geringe, jedoch nicht signifikante Zunahme der Phospholipidkonzentration und eine geringere spezifische Aktivität des Lipidcholins im Blut. (Tab. I und Abb. 2) In der Deutung dieses Befundes kann INFANTE et al. gefolgt werden, daß nach Vorbehandlung mit Phenobarbital 1) die Syntheserate oder die Freisetzung von Phospholipiden im Plasma verlangsamt und 2) der Abbau von Plasma-Phospholipiden vermindert, insgesamt also der Umsatz verzögert ist.

Obwohl die durch Phenobarbital induzierbaren Enzyme zum Teil auch in anderen Organen wie Haut, Darm, Niere und Gehirn nachgewiesen wurden (GILLETTE 1963), scheint doch dort keine Enzyminduktion stattzufinden. In der Rattenniere ist nach UEHLEKE und GREIM (1968) zwar der Mikrosomengehalt/g Niere um 12% erhöht, jedoch sind die Cytochrome und der oxydative Metabolismus nicht vermehrt. Der Befund, daß die Phosphatidylcholkonzentrationen im Herzen, Muskel und in der Lunge gegenüber den Kontrolltieren nicht verändert sind, zeigt ebenfalls, daß in anderen Organen keine mit der Leber vergleichbare Wirkung durch Vorbehandlung mit Phenobarbital eintritt.

4.2.2. Umsatz von Phosphatidylcholin

Auf Grund der spezifischen Aktivitäten von Phosphorylcholin und Phosphatidylcholin konnte in den untersuchten Organen der Ein-

bau von Cholin in das Lipidcholin berechnet und mit dem unter Kontrollbedingungen verglichen werden. Es ergab sich, daß im Herzen sowohl die Phosphorylierungsgeschwindigkeit als auch die Einbaugeschwindigkeit von Phosphorylcholin in das Lipidcholin um 30 - 40% verlangsamt sind. Die Abnahme der Konzentration und Aktivität des GPC um 30 - 40 % weisen daraufhin, daß auch der Abbau von Phosphatidylcholin verlangsamt ist. Dies erklärt, warum trotz verminderter Synthese die Phosphatidylcholinkonzentration sich nicht veränderte.

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der verminderten Synthese von Phosphatidylcholin und der Hemmung der oxydativen Phosphorylierung durch Barbiturate (ALRIDGE und PARKER 1960). Dadurch käme es zu einer Abnahme von energiereichen Phosphatesteren, die für die ersten Schritte der Phospholipidsynthese, die Phosphorylierung von Cholin und die Bildung von CDP-Cholin, nötig sind.

Differenzierter sind die Veränderungen zu betrachten, die sich in der Lunge nach Vorbehandlung mit Phenobarbital ergeben: Die Synthese des Phosphatidylcholins ist gegenüber den Kontrolltieren nicht verändert (Tab. IVb). Dagegen sind die spezifischen Aktivitäten des Phosphatidylcholins und des GPC und die GPC-Konzentration um 20 - 30% vermindert (Abb. 7 und Tab. I). Daraus kann man den Schluß ziehen, daß zwar nicht die Synthese, wohl aber der Abbau von Phosphatidylcholin verlangsamt ist. Diese Abbauphemmung führt auch zu einer signifikant niedrigeren Cholin-Konzentration (Tab. I), die ihrerseits wieder eine deutlich höhere spezifische Aktivität des Cholins bedingt.

Im Skelettmuskel findet man nach Vorbehandlung mit Phenobarbital eine vermehrte Inkorporation von Aktivität ins Lipidcholin, obwohl die Lipidcholinkonzentration nicht zunimmt. Der gleiche Befund war bereits von SCHWARTZKOPFF und von BAUMGARTEN (Inaugural-Dissertation in Vorbereitung) erhoben worden.

Im Rahmen der bisher bekannten Stoffwechselwege (siehe Einleitung) sind drei Erklärungsmöglichkeiten denkbar:

- 1.) Die Synthese über den Kennedy-Weg ist durch Phenobarbital stark beschleunigt.

- 2.) Es findet eine schrittweise Methylierung von Phosphatidyl-
äthanolamin statt, wobei die Methylgruppen von dem injizier-
ten Cholin stammen (vgl. 1.4.)
- 3.) Es findet ein Austausch des Cholins im Lipid mit dem freien
Cholin statt (vgl. 1.5.)

Überlegung 1 wird durch die Befunde widerlegt. Wenn der Lipid-
aufbau stark beschleunigt wäre, so müßte sich das auch in der
spezifischen Aktivität des Phosphorylcholins und einer erhöhten
Phosphorylierungsrate ausdrücken. Die Resultate zeigen jedoch,
daß die Phosphorylierung von Cholin nicht beschleunigt ist
(Tab.IIIa).

ad 2 + 3.) SCHWARTZKOPFF konnte durch gleichzeitige Gabe von
Me - ^3H - Cholin und 1-2 - ^{14}C - Cholin nachweisen, daß kein
vermehrter Einbau von Cholin-Methylgruppen über S-Adenosyl-
Methionin stattfindet. Die gleichzeitige Verabreichung von
 ^{32}P und 1-2 - ^{14}C - Cholin zeigte jedoch bei Phenobarbital-be-
handelten Tieren einen wesentlich höheren Einbau von ^{14}C , aber
nicht von ^{32}P , was darauf hinweist, daß das Cholin im Phospho-
lipid mit dem freien Cholin ausgetauscht wird. Dieser Aus-
tausch müßte nach Vorbehandlung mit Phenobarbital erheblich
gesteigert sein.

4.3. Wirkung der Urethannarkose auf den Phospholipidstoffwechsel

In der Narkose ist die Umsatzzeit der Phospholipide des Gehirns
um 15% verlängert (DAWSON und RICHTER 1950). Die Inkorporation
von ^{32}P in Phosphatidylcholin ist um 75% reduziert, die in
Phosphatidyläthanolamin um 67% (ANSELL und DOHMEN 1957). Die
GPC-Konzentration des Gehirns fällt um 25% ab, während die
Cholin - und Acetylcholin - Konzentrationen um 20 - 50% zu-
nehmen (DROSS und KEWITZ 1967 und 1968). Diese Veränderungen
im Gehirn treten nicht nur während der Urethannarkose auf,
sondern auch nach Barbituraten (ANSELL und DOHMEN 1957;
ANSELL und MORGAN 1958). Die Verlangsamung des Phospholipid-
umsatzes läßt jedoch keinen Zusammenhang mit einer Verminderung
der oxydativen Phosphorylierung und dem Mangel an energie-

reichen Phosphatestern erkennen, da kein Effekt bei den Vorstufen der Phospholipide auftritt (ANSELL und MORGAN 1958).

Während der Einbau von Cholin in die Phospholipide unter der Urethannarkose in der Lunge und im Skelettmuskel nicht verändert ist (Tab. III und IV, Tab. VII und VIII), tritt im Herzen eine Verminderung des Phospholipidumsatzes um 15 - 25% auf. Diese Verlangsamung des Phospholipidumsatzes ist wie im Gehirn keine Folge eines ATP-Mangels. Der ATP-Verbrauch im Herzmuskel ist in der (Halothan-)Narkose sogar 3 - 4fach vermindert, und dieser Minderverbrauch ist auch nicht die Folge einer Einschränkung der ATP-Produktion (SPICKERMANN, BRÜCKNER, EBERLEIN, GREBE, KÜBLER, LOHR und BRETSCHNEIDER 1968).

5. Zusammenfassung

In den Methylgruppen radiomarkiertes ^{14}C -Cholin wurde Ratten unter Kontrollbedingungen, nach 3-tägiger Vorbehandlung mit 80 mg/kg Phenobarbital und während der Urethannarkose i.v. injiziert. Die spezifischen Aktivitäten von Cholin, Phosphorylcholin, Phosphatidylcholin und Glycerylphosphorylcholin (GPC) wurden nach Inkorporationszeiten zwischen 1 Minute und 1 Stunde im Blut, im Herzen, im Skelettmuskel und in der Lunge bestimmt.

Die spezifische Aktivität des Cholins fällt in dem untersuchten Zeitraum im Blut und in den drei Organen steil ab. Die spezifische Aktivität des Phosphorylcholins hat im Herzen und im Muskel ein Maximum zwischen der 10. und 20. Minute, in der Lunge zwischen der 3. und 5. Minute. Die Maxima werden im Herzen und im Muskel von der abfallenden spezifischen Aktivität des Cholins im Sinne einer "precursor-product-Beziehung" geschnitten. Die Geschwindigkeit der Phosphorylierung beträgt im Herzen ca. 8 nmol/g/min und im Muskel 3,4 nmol/g/min.

Die spezifische Aktivität des Phosphatidylcholins steigt überall kontinuierlich an, liegt aber auch nach einer Stunde noch unter der des Cholins und Phosphorylcholins. Die näherungsweise berechneten Umsatzzeiten des Phosphatidylcholins betragen im Herzen 36 Stunden, im Muskel 44 Stunden und in der Lunge 9 - 10 Stunden.

Die spezifische Aktivität des GPC liegt im Blut, im Herzen und im Muskel deutlich über der des Phosphatidylcholins. Es ist wahrscheinlich, daß dies auf eine Inhomogenität der Phosphatidylcholinfraktion zurückzuführen ist.

Nach Vorbehandlung mit Phenobarbital ist der Phospholipidumsatz im Herzen um 20 - 40% vermindert. In der Lunge ist der Abbau von Phosphatidylcholin verzögert. Im Muskel wird vermehrt Cholin in das Phosphatidylcholin eingebaut, vermutlich über einen gesteigerten Austausch des Cholins im Lecithin mit dem freien Cholin.

Während der Urethannarkose ist der Cholineinbau im Muskel und in der Lunge nicht verändert. Der Phospholipidumsatz im Herzen ist um 15 - 25% vermindert.

Tabellenanhang:

Tab. V: Aktivität (in DPM/g) und spezifische Aktivität (SA) (in DPM/nmol) von Cholin, Phosphorylcholin, Lipidcholin und Glycerolphosphorylcholin (GPC) im Blut von 1 Min. bis 60 Min. nach i.v.-Gabe von $11,1 \mu\text{Ci}/100 \text{ Me-C}$ -Cholin unter Kontrollbedingungen, nach Vorbehandlung mit Phenobarbital und in der Urethannarkose. Jeder Wert als Mittelwert von 3 Tieren. Standardabweichung bei den spezifischen Aktivitäten.

Zeit in Min.		Cholin		Phosphorylcholin		Lipidcholin		GPC	
		Aktiv.	SA	Aktiv.	SA	Aktiv.	SA	Aktiv.	SA
1	Kontr.	10000	8400 ± 1100	650	$34,4 \pm 2$	-	-	-	-
	Phenob.	112000	9080 ± 790	370	$16,5 \pm 2$	-	-	-	-
	Ureth.	96000	7100 ± 80	480	$33,6 \pm 3$	-	-	-	-
5	Kontr.	30000	2336 ± 116	1000	53 ± 10	-	-	-	-
	Phenob.	38000	3750 ± 620	830	43 ± 3	-	-	-	-
	Ureth.	42000	2950 ± 150	1350	70 ± 3	-	-	-	-
10	Kontr.	15000	1064 ± 210	1000	53 ± 10	-	-	10	$2,3 \pm 0,5$
	Phenob.	21800	1950 ± 180	920	$48 \pm 8,7$	-	-	-	-
	Ureth.	22300	2000 ± 50	1130	69 ± 5	-	-	13,5	$3,3 \pm 0,4$
20	Kontr.	5500	500 ± 50	1800	97 ± 7	500	$0,27 \pm 0,06$	20	$2,9 \pm 0,8$
	Phenob.	9300	840 ± 25	920	51 ± 12	385	$0,19 \pm 0,01$	15	$2,3 \pm 1,2$
	Ureth.	7300	740 ± 118	1250	78 ± 4	770	$0,31 \pm 0,03$	14	$3,5 \pm 0,5$
60	Kontr.	1500	145 ± 24	900	56 ± 7	5000	$2,1 \pm 0,60$	30	$5,0 \pm 1,4$
	Phenob.	1500	121 ± 4	650	33 ± 6	2000	$0,76 \pm 0,04$	18	$3,5 \pm 0,7$
	Ureth.	1450	172 ± 8	1000	66 ± 8	3300	$1,4 \pm 0,4$	41	$6,6 \pm 1,7$

Tab. VI: Aktivität (in DPM/g) und spezifische Aktivität (SA) (in DPM/nmol) im Herzen.
Einzelheiten wie Tab. V.

Zeit in Min.	Cholin			Phosphorylcholin			Lipidcholin		GPC	
		Aktiv.	SA	Aktiv.	SA		Aktiv.	SA	Aktiv.	SA
1	Kontr.	30000	3080 ± 100	68000	341 ± 27		5500	0,51 ± 0,1	135	1,2 ± 0,3
	Phenob.	348000	6800 ± 590	40000	216 ± 37		13000	0,99 ± 0,2	150	2,1 ± 0,01
	Ureth.	280000	4360 ± 490	71000	412 ± 37		6700	0,49 ± 0,1	113	1,6 ± 0,5
5	Kontr.	74000	1550 ± 170	75000	372 ± 51		15500	0,98 ± 0,1	550	4,7 ± 1,5
	Phenob.	95000	2092 ± 52	110000	633 ± 25		18000	1,24 ± 0,2	290	3,8 ± 1,6
	Ureth.	94000	1880 ± 200	81000	458 ± 28		11000	0,74 ± 0,1	210	3,5 ± 0,4
10	Kontr.	30000	447 ± 103	90400	450 ± 120		22000	1,44 ± 0,5	660	5,1 ± 0,8
	Phenob.	65500	1367 ± 214	117000	800 ± 154		23000	1,49 ± 0,4	-	-
	Ureth.	47000	940 ± 50	100000	615 ± 45		18000	1,15 ± 0,1	312	4,5 ± 0,3
20	Kontr.	20000	275 ± 5	85000	484 ± 31		41000	3,6 ± 0,9	780	6,5 ± 0,8
	Phenob.	29000	702 ± 137	152000	847 ± 13		69000	5,1 ± 0,6	605	7,8 ± 1,0
	Ureth.	24000	450 ± 36	92000	616 ± 20		38000	2,5 ± 0,3	-	-
60	Kontr.	10000	232 ± 16	65000	274 ± 13		120000	9,6 ± 1,7	1100	11,8 ± 0,5
	Phenob.	16000	312 ± 30	72000	365 ± 21		120000	7,9 ± 0,9	970	9,3 ± 1,4
	Ureth.	11000	318 ± 49	65000	390 ± 28		118000	8,4 ± 1,0	810	9,7 ± 1,4

Tab. VII: Aktivität (in DPM/g) und spezifische Aktivität (SA) (in DPM/nmol) im Muskel.
Einzelheiten wie Tab. V.

Zeit in Min.		Cholin		Phosphorylcholin		Lipidcholin		GPC	
		Aktiv.	SA	Aktiv.	SA	Aktiv.	SA	Aktiv.	SA
1	Kontr.	13000	2500 ± 307	9750	320 ± 52	4000	0,43 ± 0,01	37	1,6 ± 0,4
	Phenob.	122000	1911 ± 402	11050	251 ± 82	7600	0,86 ± 0,26	87	3,5 ± 0,4
	Ureth.	148000	3070 ± 610	13500	375 ± 10	9100	1,08 ± 0,1	57	2,8 ± 0,5
5	Kontr.	140000	1950 ± 190	15500	550 ± 20	13000	1,47 ± 0,03	139	5,0 ± 1,8
	Phenob.	89000	1188 ± 210	12100	463 ± 17	17000	2,1 ± 0,5	-	-
	Ureth.	125000	2200 ± 335	26000	570 ± 93	10800	1,3 ± 0,3	115	5,4 ± 1,2
10	Kontr.	66000	1022 ± 180	24100	1050 ± 50	34000	2,8 ± 0,5	167	5,8 ± 1,7
	Phenob.	39750	630 ± 135	25000	675 ± 136	-	-	195	7,7 ± 3,5
	Ureth.	65000	1230 ± 418	34000	936 ± 105	29500	3,1 ± 0,3	133	6,2 ± 1,3
20	Kontr.	39300	661 ± 30	20400	886 ± 200	52000	5,6 ± 0,7	300	10 ± 1,7
	Phenob.	21700	360 ± 120	15500	408 ± 270	62000	8,4 ± 1,3	235	8,7 ± 0,3
	Ureth.	37700	700 ± 67	23500	1003 ± 216	38200	4,2 ± 1,3	-	-
60	Kontr.	21600	337 ± 128	12600	294 ± 27	103000	12,7 ± 1,7	490	18,8 ± 2,6
	Phenob.	11000	122 ± 20	11800	310 ± 117	151000	19,8 ± 5,2	570	22,7 ± 5,0
	Ureth.	11300	375 ± 10	13600	486 ± 100	128000	15,4 ± 4,7	530	20,9 ± 4,1

Tab. VIII: Aktivität (in DPM/g) und spezifische Aktivität (SA) (in DPM/nmol) in der Lunge.
Einzelheiten wie in Tab. V.

Zeit in Min.	Cholin		Phosphorylcholin		Lipidcholin		GPC		
	Aktiv.	SA	Aktiv.	SA	Aktiv.	SA	Aktiv.	SA	
1	Kontr.	180000	1436 ± 180	315000	1128 ± 77	96000	5,9 ± 0,6	700	3,9 ± 0,5
	Phenob.	330000	4210 ± 440	205000	794 ± 114	57000	4,3 ± 1,0	-	-
	Ureth.	186000	1583 ± 327	318000	1360 ± 86	195000	12,4 ± 3,1	660	4,3 ± 0,5
5	Kontr.	52000	334 ± 20	210000	1251 ± 363	220000	12,8 ± 4,5	1520	8,9 ± 0,9
	Phenob.	81000	781 ± 137	270000	1042 ± 270	175000	10,5 ± 2,0	780	6,6 ± 0,07
	Ureth.	62000	595 ± 33	190000	877 ± 50	244000	15,1 ± 3,2	1100	8,1 ± 1,6
10	Kontr.	26000	140 ± 44	190000	861 ± 35	375000	22,8 ± 1,8	2300	12,2 ± 1,0
	Phenob.	44000	480 ± 120	165000	607 ± 17	230000	15,7 ± 2,2	880	7,7 ± 1,1
	Ureth.	46000	428 ± 70	210000	919 ± 12	361000	23,3 ± 4,4	1220	10,3 ± 0,7
20	Kontr.	20000	145 ± 5	95000	459 ± 3	470000	32,7 ± 3,0	2800	17,1 ± 2,0
	Phenob.	24000	228 ± 14	87000	343 ± 12	355000	23,7 ± 2,5	1900	13,8 ± 3,5
	Ureth.	17500	129 ± 23	86600	413 ± 80	654000	36,9 ± 1,5	2400	15,5 ± 1,9
60	Kontr.	10200	75 ± 6	33000	116 ± 7	690000	43,9 ± 1,8	6700	35,6 ± 3,1
	Phenob.	12300	141 ± 13	50000	183 ± 17	585000	35,1 ± 1,5	3900	24,3 ± 2,6
	Ureth.	6800	84 ± 16	30000	137 ± 16	910000	53,5 ± 3,6	4600	31,9 ± 4,0

LITERATURVERZEICHNIS

- ABE, M., AKINO, T., OHNO, K.: The formation of lecithin from lysolecithin in rat lung supernatant
Biochim. Biophys. Acta 280, 275-280 (1972)
- ABRAMS, M.E. and WIGGLESWORTH, A.: The biological half-life of pulmonary surface-active agents
Biochem. J. 111, 21p (1968)
- AKINO, T., ABE, M., ARAI, T.: Studies on the biosynthetic pathways of molecular species of lecithin by rat lung slices
Biochim. Biophys. Acta 248, 274-281 (1971)
- ALRIDGE, W.N. and PARKER, V.H.: Barbiturates and oxydative phosphorylation
Biochem. J. 76, 47-56 (1960)
- ANSELL, G.B. and DOHMEN, H.: The metabolism of individual phospholipids in the rat brain during hypoglycaemia, anaesthesia, and convulsions
J. Neurochem. 2, 1-10 (1957)
- ANSELL, G.B. and MORGAN, A.: The effect of thiopentane, azacyclonal (frenquel) and reserpin on rat brain phospholipid metabolism in vivo
Biochem. J. 69, 30p-31p (1958)
- ANSELL, G.B. and SPANNER, S.: Studies on the origin of choline in the brain of the rat
Biochem. J. 122, 741-750 (1971)
- ARIAS, I.M., GARTNER, L., FURMAN, M., WOLFSON, S.: Studies of the effect of several drugs on hepatic glucuronide formation in newborn rats and humans
Ann. N.Y. Acad. Sci. 111, 274-280 (1963)
- ARVIDSON, G.A.E.: Biosynthesis of phosphatidylcholines in rat liver
European J. Biochem. 2, 415-421 (1968)
- BAILEY, E., TAYLOR, C.B. and BARTLEY, W.: Turnover of mitochondrial components of normal and essential-fatty-acid deficient rats
Biochem. J. 104, 1026-1032 (1967)
- BALINT, J.A., BEELER, D.A., TREBLE, D.H., SPITZER, H.L.: Studies in the biosynthesis of hepatic and biliary lecithins
J. Lipid Res. 8, 486-493 (1967)
- BJERVE, K.S.: Lecithin biosynthesis in the rat studied with phosphonate analogues of phosphorylcholine
Biochim. Biophys. Acta 270, 348-363 (1972)

- BJERVE, K.S.: The Ca^{2+} - dependant biosynthesis of lecithin, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in rat liver subcellular particles
Biochim. Biophys. Acta 296, 549-562 (1973)
- BJERVE, K.S. and BREMER, J.: Sulfocholine and choline metabolism in the rat
Biochim. Biophys. Acta 176, 570-583 (1969)
- BJØRNSTAD, P. and BREMER, J.: In vivo studies on pathways for the biosynthesis of lecithin in the rat
J. Lipid Res. 7, 38-45 (1966)
- BORKENHAGEN, L.F., KENNEDY, E.P. and FIELDING, L.: Enzymatic formation and decarboxylation of phosphatidylserine
J. Biol. Chem. 236, PC 28 (1961)
- BREMER, J., FIGARD, P. and GREENBERG, D.M.: The biosynthesis of choline and its relation to phospholipid metabolism
Biochim. Biophys. Acta 43, 477-488 (1960)
- BREMER, J. and GREENBERG, D.M.: Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin
Biochim. Biophys. Acta 46, 205-216 (1961)
- COLLINS, F.D.: Studies on phospholipids: The composition of rat liver lecithins
Biochem. J. 88, 319-324 (1963)
- DAVISON, S.C. and WILLS, E.D.: Changes in the phospholipid composition of the liver endoplasmatic reticulum after induction with drugs and carcinogens
Biochem. Soc. Transactions 1, 362-364 (1973)
- DAWSON, R.M.C.: The role of GPC and GPE in liver phospholipid metabolism
Biochem. J. 59, 5-8 (1955a)
- DAWSON, R.M.C.: The incorporation of labelled phosphate into the phosphoglycerides of intact rat liver
Biochem. J. 61, 552-555 (1955b)
- DAWSON, R.M.C.: Liver GPC-Diesterase
Biochem. J. 62, 689-693 (1956)
- DAWSON, R.M.C. and RICHTER, H.: The phosphorus metabolism of the brain
Proc. roy. Soc. 137, 252-267 (1950)
- DILS, R.R. and HÜBSCHER, G.: The incorporation in vitro of $\text{Me-}^{14}\text{C}$ -Choline into the phospholipids of rat liver mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 32, 293-294 (1959)

- DILS, R.R. and HÜBSCHER, G.: Metabolism of phospholipids
Biochim. Biophys. Acta 46, 505-513 (1961)
- DROSS, K. und KEWITZ, H.: Der Einbau von Cholin in das Acetylcholin während der Narkose und bei der DFP-Vergiftung
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 257, 13-25 (1967)
- DROSS, K. und KEWITZ, H.: Konzentration von Acetylcholin, Cholin und GPC im Gehirn während der Narkose und bei der DFP-Vergiftung
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 260, 107-116 (1968)
- DROSS, K. und KEWITZ, H.: Concentration and Origin of choline in the rat brain
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 91-106 (1972)
- ERBLAND, J.F. and MARINETTI, G.V.: The enzymatic acylation and hydrolysis of lysolecithin
Biochim. Biophys. Acta 106, 128-138 (1965a)
- ERBLAND, J.F. and MARINETTI, G.V.: The Metabolism of lysolecithin in rat liver particulate systems
Biochim. Biophys. Acta 106, 139-144 (1965b)
- FROSOLONO, M.F., SLIVKA, S. and CHARMS, B.L.: Acyl transferase activities in dog lung microsomes
J. Lipid Res. 12, 96-103 (1971)
- GILLETTE, J.R.: Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic oxydation
Fortschr. Arzneimittel-Forsch. 6, 11 (1963)
- GROSS, N.J., GETZ, G.S. and RABINOWITZ, M.: Apparent turnover of mitochondrial desoxyribonucleic acid and mitochondrial phospholipids in the tissues of the rat
J. biol. Chem. 244, 1552-1562 (1969)
- GROTH, D.P., BAIN, J.A. and PFEIFFER, C.C.: The comparative distribution of labelled 2-dimethylaminoethanol and choline in the mouse
J. Pharmac. Exp. Ther. 124, 290-295 (1958)
- GURR, M.I., PROTTEY, C. and HAWTHORNE, J.N.: Phospholipids of liver cell fractions: Incorporation of ^{32}P orthophosphate in vivo in normal and regenerating rat liver
Biochim. Biophys. Acta 106, 357 (1965)
- HOLTZMAN, J.L. and GILLETTE, J.R.: The effect of phenobarbital on the synthesis of microsomal phospholipids in female and male rats
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 639-643 (1966)

- HOLTZMAN, J.L. and GILLETTE, J.R.: The effect of phenobarbital on the turnover of microsomal phospholipid in male and female rats
J. Biol. Chem. 243, 3020-3028 (1968)
- INFANTE, R., PETIT, D., POLONOVSKI, J. and CAROLI, J.: Microsomal phospholipid biosynthesis after phenobarbital administration
Experientia 27, 640-641 (1971)
- KANOH, H.: Biosynthesis of molecular species of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine from radioactive precursors in rat liver slices
Biochim. Biophys. Acta 176, 756-763 (1969)
- KENNEDY, E.P. and WEISS, S.B.: The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids
J. Biol. Chem. 222, 193-214 (1956)
- KEWITZ, H.: Nachweis von 4-Amino-n-butrylcholin im Warmblüter-gehirn
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharm. 237, 308-318 (1959)
- KORNBERG, A. and PRICER, W.E.: American Society of Biological Chemists, Forty-Third Annual Meeting
Federation Proc. 11, 242 (1952)
- LANDS, W.E.M.: Metabolism of glycerolipides II
J. Biol. Chem. 235, 2233-2237 (1960)
- LANDS, W.E.M. and MERKL, I.: Metabolism of glycerolipides III
J. Biol. Chem. 238, 898-904 (1963)
- McMURRAY, W.C. and DAWSON, R.M.C.: Phospholipid exchange reactions within the liver cell
Biochem. J. 112, 91-108 (1969)
- MONTFORT, A., VAN GOLDE, L.M.G. and VAN DEENEN, L.L.M.: Molecular species from lecithin from various animal tissues
Biochim. Biophys. Acta 231, 335-342 (1971)
- MORGAN, T.E., FINLEY, T.N. and FIALKOW, H.: Comparison of the composition and surface activity of alveolar and whole lung lipids in the dog
Biochim. Biophys. Acta 106, 403-413 (1965)
- ORRHENIUS, S., ERICSSON, J.L.E. and ERNSTER, L.: Phenobarbital induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system
J. Cell. Biol. 25, 627-639 (1965)
- PENNINGTON, R.J. and WORSFOLD, M.: Biosynthesis of lecithin by skeletal muscle
Biochim. Biophys. Acta 176, 774-782 (1969)

- PLIMMER, R.H.A. and BURCH, W.J.N.: Esters of phosphoric acid: Phosphorylaminoethanol and phosphorylcholine
Biochem. J. 31, 398-409 (1937)
- REHBINDER, D. and GREENBERG, D.M.: Studies on the methylation of ethanolamine phosphatides by liver preparations
Arch. Biochem. Biophys. 102, 110-115 (1965)
- REMMER, H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Leber-mikrosomen unter dem Einfluß von Luminal
Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 232, 279 (1959)
- REMMER, H.: Die Ursache der Gewöhnung an oxydable Barbiturate
Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 244, 311 (1963)
- REMMER, H. und MERKER, H.J.: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital
Klin. Wochenschrift 41, 276-283 (1963)
- RESCIGNO, A. und SEGRE, G.: Drug and Tracer Kinetics
Blaisdell Publishing Company 1966
- ROBERTSON, J.S.: Theory and use of tracers in determining transfer rates in biological systems
Physiological Reviews 37, 133-154 (1957)
- SALERNO, D.M. and BEELER, D.A.: Biosynthesis of phospholipids and their precursors in rat liver involving de novo methylation and base exchange pathways, in vivo
Biochim. Biophys. Acta 326, 325-338 (1973)
- SALISBURY-MURPHY, S., RUBINSTEIN, D. and BECK, J.C.: Lipid metabolism in lung slices
Am. J. Physiol. 211, 988-992 (1966)
- SPICKERMANN, P.G., BRUCKNER, J., EBERLEIN, H.J., GREBE, D., KÜBLER, W., LOHR, B., BRETSCHNEIDER, H.J.: The influence of barbiturates, halothane and droperidolfentanyl on the metabolism of high energy phosphates of dog heart
Proc. Fourth World Congress of Anaesthesiologists London 1968
- SPITZER, H.L., MORRISON, K. and NORMAN, J.R.: The incorporation of L-Me-¹⁴C-Methionine and Me-³H-Choline into lung phosphatides
Biochim. Biophys. Acta 152, 552-558 (1968)
- SPITZER, H.L., NORMAN, J.R. and MORRISON, K.: In vivo studies of Me-³H-Choline and 1,2-¹⁴C-Choline incorporation into lung and liver lecithins
Biochim. Biophys. Acta 176, 584-590 (1969)
- STEIN, Y. and STEIN, O.: Metabolism of labelled lysolecithin, lysophosphatidylethanolamine and lecithin in the rat
Biochim. Biophys. Acta 116, 95-107 (1966)

- STEIN, Y. and STEIN, O.: Effect of phenobarbital on rat liver
Acyl-phosphohydrolases
Israel J. Med. Sci. 2, 985-990 (1969)
- STONE, W.E.: Acetylcholine in the brain I
Arch. Biochem. 59, 181-192 (1955)
- SUNDLER, R., ARVIDSON, G. and AKESSON, B.: Pathways for the in-
corporation of choline into rat liver phosphatidylcholines
in vivo
Biochim. Biophys. Acta 280, 559-568 (1972)
- TATTIE, N.H., BENNETT, H.R. and CYR, R.: Maximum and minimum
values for lecithin classes from various biological sources
Can. J. Biochem. 46, 819-824 (1968)
- THOMAS, T. Jr. and RHOADES, R.A.: Incorporation of palmitate- 1^{14}C
into lung tissue and "alveolar" lecithin
Am. J. Physiol. 219, 1535-1538 (1970)
- TIERNEY, D.F., CLEMENTS, J.A. and TRAHAN, H.J.: Rates of replace-
ment of lecithins and alveolar instability in rat lung
Am. J. Physiol. 213, 3, 671-676 (1967)
- TREBLE, D.H., FRUMKIN, J.S., BALINT, J.A. and BEELER, D.A.: The
entry of choline into lecithin, in vivo, by base exchange
Biochim. Biophys. Acta 202, 163-171 (1970)
- UEHLEKE, H. and GREIM, H.: Stimulation of drug oxydation in kidney
microsomes
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.exp.Path. 261, 152-161
(1968)
- VAN GOLDE, L.M.G., SCHERPHOF, G.L. and VAN DEENEN, L.L.M.: Bio-
synthetic pathways in the formation of individual mole-
cular species of rat liver mitochondria
Biochim. Biophys. Acta 176, 635-637 (1969)
- VEREYKEN, J.M., MONTFORT, A. and VAN GOLDE, L.M.G.: Some studies
on the biosynthesis of the molecular species of phosphatidyl-
choline from rat lung and phosphatidylcholine and phos-
phatidylethanolamine from rat liver
Biochim. Biophys. Acta 260, 70-81 (1972)
- WAKIL, S.J.: Lipid Metabolism
Academic Press 1970
- WEINHOLD, P.A. and VILLEE, C.A.: Phospholipid metabolism in the
liver and lung of rats during development
Biochim. Biophys. Acta 106, 540-550 (1965)

- WEISS, S.B., SMITH, S.W. and KENNEDY, E.P.: The enzymatic formation of lecithin from CDP-Choline and 1,2-Diglyceride
J. Biol. Chem. 231, 53-64 (1958)
- WILGRAM, G.F., HOLOWAY, C.F. and KENNEDY, E.P.: The content of CDP-Choline in the livers of normal and choline-deficient rats
J. Biol. Chem. 235, 37-39 (1960)
- WILGRAM, G.F. and KENNEDY, E.P.: Intracellular distribution of some enzymes catalysing reactions in the biosynthesis of complex lipids
J. Biol. Chem. 238, 2615-2619 (1963)
- WILSON, J.D., GIBSON, K.D. and UDENFRIEND, S.: Studies on the precursors of the methyl groups of choline in rat liver
J. Biol. Chem. 235, 3213-3217 (1960)
- WIRTZ, K.W.A. and ZILVERSMIT, D.B.: The use of phenobarbital and carbon tetrachloride to examine liver phospholipid exchange in intact rats
Biochim. Biophys. Acta 187, 468-476 (1969)
- WITTENBERG, J. and KORNBERG, A.: Choline Phosphokinase
J. Biol. Chem. 202, 431-444 (1953)
- WOLFE, B.M.J., ANHALT, B., BECK, J.C. and RUBINSTEIN, D.: Lipid metabolism in rabbit lungs
Can. J. Biochem. 48, 170-177 (1970)
- YOUNG, D.L., POWELL, G. and McMILLAN, W.O.: Phenobarbital-induced alterations in phosphatidylcholine and triglycerid synthesis in hepatic endoplasmatic reticulum
J. Lipid Res. 12, 1-8 (1971)
- ZEIDENBERG, P., ORRHENIUS, S. and ERNSTER, L.: Increase in levels of glucuronylating enzymes and associated rise in activities of mitochondrial oxydative enzymes upon phenobarbital administration in the rat
J. Cell. Biol. 32, 528-531 (1967)
- ZILVERSMIT, D.B., ENTENMAN, C. and FISHLER, M.C.: On the calculation of "turnover time" and "turnover rate" from experiments involving the use of labeling agents
J. Gen. Physiol. 26, 325-331 (1943)

Herrn Prof. Dr. med. Kewitz danke ich für die Überlassung des Themas, die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut sowie für die Unterstützung bei der gedanklichen Abfassung der Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Dr. vet. med. O. Pleul für seine große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente.

LEBENS LAUF

Name:	Rudolf Mück
20. 9. 1949	geboren in Leonberg/Württ.
1956 - 1960	Besuch der Grundschule in Berlin
1960 - 1969	Besuch des humanistischen Canisius-Kolleg - Gymnasiums in Berlin
1969	Abitur
1969 - 1971	Medizinstudium an der FU Berlin
1971	Physikum
1971 - 1972	Medizinstudium an der Universität Tübingen
1972 - 1975	Medizinstudium an der FU Berlin
13. 2. 1975	Medizinisches Staatsexamen
	Gesamtnote "sehr gut"
ab 1.4.1975	Medizinalassistent an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen

INDEX

Einleitung	1
1. Die Bedeutung der Statistik	2
2. Die Aufgaben der Statistik	3
3. Die Methoden der Statistik	4
4. Die Ergebnisse der Statistik	5
5. Die Anwendung der Statistik	6
6. Die Bedeutung der Statistik	7
7. Die Aufgaben der Statistik	8
8. Die Methoden der Statistik	9
9. Die Ergebnisse der Statistik	10
10. Die Anwendung der Statistik	11
11. Die Bedeutung der Statistik	12
12. Die Aufgaben der Statistik	13
13. Die Methoden der Statistik	14
14. Die Ergebnisse der Statistik	15
15. Die Anwendung der Statistik	16
16. Die Bedeutung der Statistik	17
17. Die Aufgaben der Statistik	18
18. Die Methoden der Statistik	19
19. Die Ergebnisse der Statistik	20
20. Die Anwendung der Statistik	21
21. Die Bedeutung der Statistik	22
22. Die Aufgaben der Statistik	23
23. Die Methoden der Statistik	24
24. Die Ergebnisse der Statistik	25
25. Die Anwendung der Statistik	26
26. Die Bedeutung der Statistik	27
27. Die Aufgaben der Statistik	28
28. Die Methoden der Statistik	29
29. Die Ergebnisse der Statistik	30
30. Die Anwendung der Statistik	31
31. Die Bedeutung der Statistik	32
32. Die Aufgaben der Statistik	33
33. Die Methoden der Statistik	34
34. Die Ergebnisse der Statistik	35
35. Die Anwendung der Statistik	36
36. Die Bedeutung der Statistik	37
37. Die Aufgaben der Statistik	38
38. Die Methoden der Statistik	39
39. Die Ergebnisse der Statistik	40
40. Die Anwendung der Statistik	41
41. Die Bedeutung der Statistik	42
42. Die Aufgaben der Statistik	43
43. Die Methoden der Statistik	44
44. Die Ergebnisse der Statistik	45
45. Die Anwendung der Statistik	46
46. Die Bedeutung der Statistik	47
47. Die Aufgaben der Statistik	48
48. Die Methoden der Statistik	49
49. Die Ergebnisse der Statistik	50
50. Die Anwendung der Statistik	51
51. Die Bedeutung der Statistik	52
52. Die Aufgaben der Statistik	53
53. Die Methoden der Statistik	54
54. Die Ergebnisse der Statistik	55
55. Die Anwendung der Statistik	56
56. Die Bedeutung der Statistik	57
57. Die Aufgaben der Statistik	58
58. Die Methoden der Statistik	59
59. Die Ergebnisse der Statistik	60
60. Die Anwendung der Statistik	61
61. Die Bedeutung der Statistik	62
62. Die Aufgaben der Statistik	63
63. Die Methoden der Statistik	64
64. Die Ergebnisse der Statistik	65
65. Die Anwendung der Statistik	66
66. Die Bedeutung der Statistik	67
67. Die Aufgaben der Statistik	68
68. Die Methoden der Statistik	69
69. Die Ergebnisse der Statistik	70
70. Die Anwendung der Statistik	71
71. Die Bedeutung der Statistik	72
72. Die Aufgaben der Statistik	73
73. Die Methoden der Statistik	74
74. Die Ergebnisse der Statistik	75
75. Die Anwendung der Statistik	76
76. Die Bedeutung der Statistik	77
77. Die Aufgaben der Statistik	78
78. Die Methoden der Statistik	79
79. Die Ergebnisse der Statistik	80
80. Die Anwendung der Statistik	81
81. Die Bedeutung der Statistik	82
82. Die Aufgaben der Statistik	83
83. Die Methoden der Statistik	84
84. Die Ergebnisse der Statistik	85
85. Die Anwendung der Statistik	86
86. Die Bedeutung der Statistik	87
87. Die Aufgaben der Statistik	88
88. Die Methoden der Statistik	89
89. Die Ergebnisse der Statistik	90
90. Die Anwendung der Statistik	91
91. Die Bedeutung der Statistik	92
92. Die Aufgaben der Statistik	93
93. Die Methoden der Statistik	94
94. Die Ergebnisse der Statistik	95
95. Die Anwendung der Statistik	96
96. Die Bedeutung der Statistik	97
97. Die Aufgaben der Statistik	98
98. Die Methoden der Statistik	99
99. Die Ergebnisse der Statistik	100

